



TITLE:

抗真菌薬のin vivo 効果を予測可能
にしたin vitro 評価法の確立(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

牧, 克之

CITATION:

牧, 克之. 抗真菌薬のin vivo 効果を予測可能にしたin vitro 評価法の確立.
京都大学, 2013, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2013-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12775>

RIGHT:

抗真菌薬の *in vivo* 効果を予測可能にした

in vitro 評価法の確立

2 0 1 3

牧 克 之

目次

緒言.....	1
略号解説.....	4
第一章 血清を添加した抗真菌活性評価系の確立.....	7
実験方法.....	9
実験結果.....	15
考察.....	26
第二章 血中抗菌価と <i>in vivo</i> 効果との相関性と薬動学的解析.....	29
実験方法.....	31
実験結果	
1. 抗真菌薬投与後の血中抗菌価と <i>in vivo</i> 効果との関係.....	36
2. 最小有効濃度に基づいたアゾール系抗真菌薬の薬動学的解析.....	42
考察.....	49
第三章 血清添加培地の最小発育阻止濃度（gMIC）による echinocandin 系	
化合物の <i>in vivo</i> 効果予測.....	53
実験方法.....	54
実験結果.....	58
考察.....	65
総括.....	68
謝辞.....	71
発表論文目録.....	72
引用文献.....	74

緒言

深在性真菌症は、宿主の免疫低下が発症の原因となる日和見感染症で、近年の医療の高度化と先進化に伴いその重要性は増している(1, 2, 3)。真菌症のリスク因子として、病理学的要因は好中球減少症、食細胞不全や悪性腫瘍であり、医原的要因として、骨髄・造血幹細胞ならびに臓器移植、ステロイド薬や抗がん薬の投与などが挙げられる。対象疾患も多岐にわたり、カンジダ症、アスペルギルス症、糸状菌症、クリプトコックス症、そしてヒストプラズマ症などがある。このうち、カンジダ症とアスペルギルス症が全体の70%以上を占める。深在性真菌症は治療が遅れると予後が悪いことから、通常確定診断を待たずに治療を開始したり、発症リスクが高い場合は予防投与を実施する。現在、深在性真菌症の治療に用いられる抗真菌薬は作用メカニズム分類で4系統、わずか10種類の薬剤が市販されているに過ぎず、抗菌薬と比べるとはるかに少ない。以下に4系統の薬剤について概説する。

ポリエンマクロライド系

天然物由来のアムホテリシンB（注射剤）は、真菌細胞膜の主要ステロール成分のエルゴステロールと結合し細胞内成分の透過性亢進がもたらされ殺菌作用を発揮する(1, 4)。アムホテリシンBは、最も広域の抗真菌スペクトラムと多くの真菌種に対して殺菌効果を有する反面、重篤な腎毒性を発現することがある。アムホテリシンBの優れた抗真菌活性を生かし副作用を軽減するために、脂質担体制剤が上市されている。

アゾール系

アゾール系薬は真菌の細胞膜成分のエルゴステロール生合成経路のシトクロムP-450アイソザイムのラノステロール14 α 脱メチル化酵素を阻害し、スペクトラムなどの改

良に成功した新薬が創出され最大の系統群に発展している (5)。アゾール系薬の中でも初期に開発されたイミダゾール系 (ミコナゾール、ケトコナゾール) に比べて、トリアゾール系薬 (フルコナゾール、イトラコナゾール、ボリコナゾール) は生体内安定性やヒトのステロール合成系との選択性の点で優れている (1)。最も汎用されているフルコナゾール (6) は、優れた体内動態と安全性を有しており、カンジダ症とクリプトコッカス症の治療に用いられる。イトラコナゾールは、カンジダ症とクリプトコッカス症に加えてアスペルギルス症や輸入真菌症にも活性を有する (1)。ボリコナゾールは、カンジダ症の他、特にアスペルギルス症に対する第一選択薬となっている (1)。

ピリミジン系

フルシトシン (5-フルオロシトシン) は、真菌特異的な輸送系によって細胞内へ取り込まれ、宿主酵素によって 5-フルオロウリジン三リン酸や 5-フルオロデオキシウリジン酸へ返還され、転写過程や DNA 複製を阻害する (1)。本薬物は、主にクリプトコッカス症とカンジダ症に用いられる。

エキノカンディン系

カスポファンギン、ミカファンギン、そしてアニデュラファンギンが注射薬として国内外で上市されている。真菌の細胞壁の主成分である β -1,3-グルカン合成酵素を阻害することによって、細胞壁が脆弱化し細胞内圧により真菌細胞の膨化や破裂が起こる。エキノカンディン系薬物は、カンジダとアスペルギルスの主要菌種に対して抗真菌活性を有する (1)。

さて、2002 年に本邦で上市されたエキノカンディン系抗真菌薬のミカファンギン (7, 8, 9, 10) は、醗酵天然物 FR901379 (WF11899A, 11, 12, 13) から半合成的に最適化された。FR901379 は、他のエキノカンディンと同様に真菌症の主要原因菌種であ

るカンジダに対しては殺菌的で強力な抗菌力を有していたが、アスペルギルスに対しては抗菌力が弱く溶血性など安全性にも課題があった。しかし FR901379 はエキノカンディンでは珍しくその母核に硫酸基が付加され注射剤に適した水溶性という特長があった。

このように抗真菌薬の創出が質的にもまた量的にも困難なのは、ヒトを含む動物細胞と真菌細胞が同じ真核細胞であり、その構成成分や機能面での共通部分が多く、選択毒性が期待されるターゲットが少ないためと考えられている。

もう一つ、抗真菌薬の開発を困難にしている要因として、創薬の最適化研究の生物学的・薬学的評価の難しさが挙げられる。通常、最適化研究における評価は、① *in vitro* 抗真菌活性の測定、② *in vivo* 薬効評価（感染モデル）の順に進められるが、しばしば *in vitro* 活性と *in vivo* 活性の間に乖離が見られる。*In vitro* 抗真菌活性が *in vivo* の効果を予測できないことは、全ての誘導体を *in vivo* 感染系においてスクリーニングしなければならない、多大な労力を必要とするだけでなく、抗真菌薬の創薬の発展に支障をきたす。

このような *in vitro* 活性と *in vivo* 活性の間に乖離が見られる要因として、*in vitro* 抗真菌活性測定系における検定培地と検定菌の問題とに分けて考えることができる。たとえば、フルコナゾールは *in vitro* 抗真菌活性を測定する条件が変わると抗真菌活性が大きく変動した。つまり、当時の人工培地では高濃度まで部分抑制効果が発現し明確な MIC を決定できない (1)、また現在の標準法 (17, 18, 19) では強い活性を示す。しかしながらフルコナゾールは *in vivo* 感染モデルでは良好な薬効（延命効果や菌増殖抑制効果）を示した（非公表データ、14）。Cutler (15) は *C. albicans* の病原因子として、① 酵母型から菌糸型細胞への細胞型変換、② 宿主細胞への接着性、③ 組織破壊酵素（プロテアーゼ）の分泌などをあげ、Odds もアゾール系薬には、菌糸型細胞に対する抗菌力があることを指摘していた (16)。これらのことは、検定菌の病原性にも注意する必要があることを示唆している。一方、多くの薬剤は血清蛋白、特に血清アルブミンと結合することが知られている。エキノカンディン系抗真菌薬も例

外ではなく、高い蛋白結合作用を示すことが報告されている (1)。

現在の抗真菌活性測定は、通常 MIC 測定の標準法 [Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]、旧 National Committee for Clinical Laboratory Standards 推奨法 (17, 18) や European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST] 推奨法 (19)] に準じて行われるが、これらの方法の主目的は菌株の感受性を判断することであり、培養液中に生体成分を含まず、病原体の形態変換による感受性変化や薬物の蛋白結合など、*in vivo* 効果に影響する生体の環境が考慮されていない。一般的に薬物の *in vitro* と *in vivo* 活性の発現に必要な濃度はそれぞれ固有に存在し、両活性間の乖離の大きさが薬物ごとに異なることから、上記のような MIC 測定法は、創薬における薬物間の *in vivo* 薬効比較にそのまま使用することは難しいと思われた。

本研究の目的は、薬物の抗真菌効果が真菌の増殖抑制であることを前提として、*in vitro* と *in vivo* 活性の乖離の要因を MIC 測定系に包含させ、化合物間における *in vivo* 効果比較が可能な MIC 測定系を構築することである。そのために、カンジダ属の主要菌種である *C. albicans* を用いて、臨床有効性の明確な既存薬の *in vivo* における薬理効果を予測可能とする *in vitro* 評価系を構築して薬物動力的解析を行い、そしてエキノカンディン系誘導体の最適化研究への応用を検討した。

なお、本文中に使用した略号は以下のとおりである。

A. fumigatus: *Aspergillus fumigatus*

ATCC: American Type Culture Collection

AUC: area under the serum concentration-time curve

C_{0.5hr}: Serum concentration at 0.5 hr after administration

C. albicans: *Candida albicans*

CFU: Colony forming unit

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

C_{max}: Maximal serum concentration after treatment

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ED₅₀: 50% effective dose in survival experiment

ED₉₀: 90% effective dose in survival experiment

Est. ED₅₀: ED₅₀ estimated from MIC and pharmacokinetic parameter

Exp. ED₅₀: ED₅₀ determined experimentally

gMIC: MIC for microbial growth

HCO-60: Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HPLC: High-performance liquid chromatography

MEM: Minimum essential medium

MIC: Minimum inhibitory concentration

MOPS: 3-N-morpholino-o-propanesulfonic acid

mMIC: MIC for mycelial elongation

PK/PD: Pharmacokinetics/Pharmacodynamics

RPMI-MIC: MIC determined in modified CLSI M27-A2 or M38-A protocol

SDA: Sabouraud dextrose agar

sub-gMIC: sub-MIC for microbial growth

sub-mMIC: sub-MIC for mycelial elongation

supra-mMIC: supra-MIC for mycelial elongation

sub-MIC: sub-minimal inhibitory concentration

PAFE: Post-antifungal effect

R_f: Retention factors

SDS: Sodium dodecyl sulfate

TLC: Thin layer chromatography

Tween 80: Polyoxyethylene sorbitan monooleate

$t_{1/2}$: Elimination half-life

Tmax: Time to reach peak concentration

(第一章) 血清を添加した抗真菌活性評価系の確立

著者らは、1990 年に病原体の増殖抑制作用を有する抗真菌化合物の最適化評価に着手した際、Cutler (15) が提唱する病原因子の 3 要素の内、*C. albicans* では菌糸型細胞が病原性に関わりが強いという知見から、菌糸型細胞の発育に対する抑制効果を指標とすることが *in vitro* と *in vivo* 活性の乖離を解消できると考えた。そこで、*in vivo* における感染部位の環境を模倣するために、血清成分が菌糸型細胞を誘導すること、および血清蛋白質の存在によって化合物固有の蛋白結合による最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC) の変化を補正されることを考慮して、MIC 測定法として血清添加培地を用いることを検討した。

まず、*C. albicans* の感受性試験の検討のために、入手の簡便さから市販のウシ胎児などの各種動物の血清を試みたが、由来動物種やその添加濃度によって菌糸型細胞の発育以外にも酵母型や仮性菌糸の出現頻度に変動がみられた (データ非表示)。このような多様な形態の表現型は、血清の含有条件によってさまざまに転写系が調節され細胞内部の環境が異なり、抗真菌薬の感受性の相違の原因にもなる可能性があると考えた。従ってモデル動物における感染部位を徹底して模倣するために、マウス由来の血清を用いることと、真菌の病原性の観点から酵母型よりも菌糸型細胞に対する阻害効果を優先して評価することを目的として以下の点を感じ性測定試験の必要要件とした。

- ① 病原性が高いと考えられている菌糸型細胞に対する抗真菌効果を評価する。
- ② 培地として用いる血清として感染モデルと同じマウスの血清を用いる。
- ③ 培養液としての血清は、可能な限り希釈しない。
- ④ 生理的 pH を維持し成分の析出を回避するために、pH 緩衝剤を添加する。
- ⑤ 菌糸発育のための栄養源など他の人工物を添加しない。
- ⑥ 菌糸発育を促進するため 5% CO₂ 存在下で培養する。
- ⑦ 薬物の実働の抑制効果を測定するために最短の培養時間を設定する。

本章では、抗真菌薬の *in vivo* 薬効に影響する薬物の蛋白結合や病原真菌の病原性決定因子を念頭において血清存在下での *in vitro* および *ex vivo* 抗真菌活性測定法を検討した。

実験方法

(1) 菌株

C. albicans ATCC90028 株と *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) TIMM0063 株を用いた。*C. albicans* ATCC90028 株は MIC 測定の標準法である CLSI M27-A2 法 (17) の参照株である。*C. albicans* ATCC90028 株は、サブローデキストロース斜面寒天培地 (SDA : 2% グルコース (ナカライテスク、京都)、1% ポリペプトン (日本製薬、東京)、1.5% バクトアガー (元ベクトン・ディッキンソン アンド カンパニー、米国)、) で 30℃ で 2 日間培養し、その後室温で維持された。種菌は 1 ヶ月に 1 度凍結ストックから更新され斜面寒天培地上で増殖させて作成された。

一方、*A. fumigatus* TIMM0063 株は、帝京大学 山口英世教授から分与され、アステラス製薬における抗真菌薬スクリーニングの標準株である。本菌株は、ポテトデキストロース培地 (元ベクトン・ディッキンソン アンド カンパニー、米国) 斜面寒天培地において、30℃、7-10 日間培養され、菌体表面に成育した分生子を 0.1% Tween 80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート、ナカライテスク、京都) を含む生理食塩水中に回収した。

(2) 試薬

フルコナゾールはジフルカンとしてファイザー (東京) から購入され、イトラコナゾールは、イトリゾール (ヤンセンファーマ、東京) から原体を抽出・精製された。アムホテリシン B は、ファンギゾンとしてブリストルマイヤースクイブ (東京) から購入された。*in vitro* 試験のために、フルコナゾールとアムホテリシン B はイオン交換水に、イトラコナゾールは、10% ジメチルスルフォキシド (DMSO、ナカライテスク、京都) に溶解した。

(3) RPMI MIC 測定

C. albicans と *A. fumigatus* に対する感受性測定は、各々 CLSI M27-A2 (17) と M38-A 法 (18) に準じて実施した。培地は両菌種とも共通で、水酸化ナトリウム (NaOH、ナカライテスク、京都) で pH 7.0 に調整した 165 mM 3-*N*-morpholino-*o*-propanesulfonic acid (MOPS、シグマ アルドリッチ ジャパン、東京、) を添加した RPMI 1640 培地 (RPMI 培地、日水製薬、東京) を作成した。96 穴マイクロプレート (住友ベークライト、東京) において、適当な濃度で溶解させた薬物を RPMI 培地で希釈し 128 µg/ml に調整した。この 100 µL の薬液 (128 µg/ml) を RPMI 培地を使用して 2 倍段階希釈した。このようにして作成した希釈系列に RPMI 培地で調整した 100 µL の菌液を添加した (*C. albicans* 菌終濃度 : 約 10^3 cfu/mL、分生子終濃度 : 10^4 cfu/mL)。このマイクロプレートを 35°C で所定時間培養した (*C. albicans* : 24 時間、*A. fumigatus* : 48 時間)。MIC 判定は肉眼で実施し、*C. albicans* に対しては 80 % の増殖抑制を示す最小濃度、*A. fumigatus* に対しては増殖を認めない最小濃度を各々 MIC (RPMI MIC) とした。

(4) 血中 MIC

血清添加の感受性試験において、薬物の *C. albicans* と *A. fumigatus* に対する MIC を測定した。Slc:ICR マウス (6 週令、日本エスエルシー、静岡) から採取した血清を非働化 (56.5°C、30 分) し、0.22 µm 径 ミリポアフィルター (日本ミリポア、東京) で濾過し、-80°C で保存した。血清が希釈されないように、添加物の容量は最小限に留めた。すなわち非働化マウス血清に 1/100 量の NaOH で pH 7.4 に調整された 2M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (同仁化学研究所、熊本、HEPES-NaOH) と 1/100 量の *C. albicans* 1×10^6 cfu/mL を添加し血清培地とした。血清培地で適当に希釈した薬物溶液 (64 µg/mL) をマイクロプレート上で血清培地で希釈し、2 倍段階希釈系列を作成した。このプレートを 37°C、5 % CO₂ 下で 14 時間培養した。*C. albicans* の菌糸伸長に対する抑制効果を倒立顕微鏡 (IX70、オリンパス株式会社、東京) を用いて以下の基準で観察した。+++ : 溶剤添加群と同程度の増殖、++ : 約 60 % 以下の増殖、+ : 約 30 % 以下の増殖、± : 菌糸伸長抑制、- : 出芽抑

制もしくは菌の消失。アゾール系薬は、*C. albicans* に対して静菌的に作用し菌糸発育抑制効果を指標とした。この菌糸発育に対する抑制効果、血中 mMIC (MIC for mycelia growth) は、薬物が ± ~ - の抑制効果を示す最小濃度とした。また、++ の抑制効果を示す最小濃度を血中 sub-mMIC とした。アムホテリシン B では、殺菌的に作用するため増殖抑制を示す - の抗菌力を示す最小濃度を gMIC (MIC for growth) とし、++ の抑制効果を示す最小濃度を sub-gMIC とした。*A. fumigatus* に対しては、上記のように緩衝剤を添加した血清培地に 10^5 分生子/mL となるように添加し、アッセイプレート上で薬物の希釈段階系列を作成した。このプレートを 37°C、5% CO₂ 下で 20 時間培養した。顕微鏡判定で菌体の増殖を認めない最小濃度を血中 gMIC とし、上記の ++ の抑制効果を示す最小濃度を血中 sub-gMIC とした。

(5) 薬物投与

フルコナゾールとイトリゾール顆粒を 0.5 % メチルセルロース (和光純薬工業、大阪) で懸濁し、ゾンデを用いて Slc:ICR マウス (5 週令) に経口投与した。アムホテリシン B は、5 % グルコース溶液に溶解し静脈内投与した。体内動態試験では、薬物投与一定時間後に投与マウスを安楽死後、心臓採血により血液を採取し血清を分離した。

(6) *ex vivo* アッセイによる血中抗菌価測定と薬物濃度の推定

血清サンプルの抗真菌活性は、*ex vivo* アッセイの限界希釈法により抗菌力が検出される最大の希釈度から求められた。薬物を投与したマウスから経時的に血清を採取し、血中 MIC 測定時と同様の手順で、1/100 量の HEPES-NaOH (pH 7.4) と 1×10^6 cfu/ml の *C. albicans* または *A. fumigatus* 10^5 分生子/mL をそれぞれ混合し、マイクロプレートに 200 μ L 添加した。これを同濃度の緩衝剤と菌を含む 100 μ L の血清培地で 2 倍段階で希釈系列を作成し、血中 mMIC または gMIC 測定と同じ条件で培養した。培養後、*C. albicans* や *A. fumigatus* に対する血清添加の抗真菌活性 (MIC) と同じ判定基準に

従い mMIC や gMIC の抗菌力を維持する最大希釈度を求め、その逆数を血中抗菌価とした。血中抗菌価を決定した最大希釈度のウェルは血中 mMIC や gMIC とほぼ同等の濃度に相当し、血中抗菌価と血中 mMIC や gMIC の積はその時点の薬物濃度として推定できる。

(7) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による薬物濃度測定

薬物を投与したマウスから経時的に血清を採取し、2 倍量のメタノール（ナカライテスク、京都）で抽出した。10-20 μ L の抽出液を TSK gel ODS-80TM カラム（東ソー、東京）を装着した HPLC（日本ウォーターズ、東京）に供した。フルコナゾールの同定には、1 M NaOH で pH 7.0 に調整した 0.5% KH_2PO_4 （関東化学、東京）とアセトニトリル（和光純薬工業、大阪）を 80 : 20 の混合液を移動層とし、210 mM における紫外線吸収で検出した（20）。イトラコナゾールは、純水とアセトニトリルの 40 : 60 の混合液を移動層とし、260 mM における紫外線吸収で検出した（21）。アムホテリシン B は、メタノール : 2 mM EDTA / 0.02 M KH_2PO_4 の 77 : 23 混液を移動層とし、405 nM の紫外線吸収で検出した(22)。種々の濃度のマウス血清で調整した薬物の標準品の検出ピーク面積から検量線（標準直線）を作成し、各サンプルの面積から回帰することによって、血清サンプル中の薬物濃度を測定した。

(8) 体内動態 (PK) 解析

HPLC 法ならびに血中抗菌価法で測定したイトラコナゾールを投与したマウスの血中濃度は、1-コンパートメント・モデルを使用して PK パラメーターを算出した(23)。算出式を以下に示す。

$$C = (K_a \cdot C_0) \cdot (e^{-K_{el}t} - e^{-K_{at}t}) / (K_a - K_{el})$$

C : 薬物濃度、 K_a : 吸収速度定数、 K_{el} : 消失速度定数、 C_0 : 投与直後の血中濃度（推

定値)

(9) アゾール系薬に対するバイオオートグラフィーの確立

薬物の検出感度向上のための予備実験

C. albicans : 血清を含まない人工培地中で *C. albicans* を菌糸型として生育させるため、Odds et al の方法を改良とした(16)。界面活性剤による薬物の検出感度を向上のための条件検討を行った。50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、適当な濃度の Sodium dodecylsulphate (SDS、ナカライテスク) ならびに 1% バクトアガーを添加した Eagle's MEM 寒天培地 (抗生物質およびニュートラルレッド不含、日水製薬、東京) に 2.5×10^4 cfu/ml の *C. albicans* を接種し 8.5 cm プラスチックシャーレに作成した。この寒天培地上に適当な濃度のイトラコナゾール (5% HCO-60+10% DMSO 混液) を浸み込ませたペーパーディスク (薄型 8 mm 径、東洋濾紙、東京) を置き、37°C、5% CO₂ 下で 15-40 hr 培養し薬物の寒天培地への拡散による阻止円の形成状態を検討し、薬物の抗真菌活性が最大となる SDS 濃度を決定した。*A. fumigatus* : 上記の 50mM HEPES-NaOH (pH7.4)を含む Eagle's MEM 寒天培地に適当な濃度の SDS と Tween 80 を添加し、*A. fumigatus* 分生子を 10^5 分生子/mL となるように添加して、上記のようにイトラコナゾールを含むペーパーディスクを置き、37°C、5% CO₂ 下で 15-40 hr 培養した。薬物の抗真菌活性が最大となる 2 種の界面活性剤の組み合わせ濃度を決定した。

(10) バイオオートグラフィー

イトラコナゾールを静脈内投与したマウスから経時的に血清を採取し、10倍量のメタノールで 10 分間 2 回抽出し窒素気流で蒸発乾固させ、残渣を 1/2 倍量のメタノールに懸濁した。この 20 μ L の懸濁液を薄層クロマトグラフィー (TLC、メルク株式会社、東京) にスポットし、酢酸エチル (片山化学工業、大阪) とメタノールの 9 : 1 の移動相中で展開した。展開後 TLC プレートを乾燥させた後、 2.5×10^4 cfu/ml の *C.*

albicans を接種した 0.014 % SDS、50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) および 1% 寒天を含む Eagle's MEM 培地に設置し 1 hr 放置した。TLC プレートをはがし、37°C、5% CO₂ 下で 15-40 時間培養した。*A. fumigatus* の場合は、0.01% SDS と 0.001% Tween 80 を添加して、同様に培養した。イトラコナゾール標準品は、5% DMSO と 10% HCO-60 に溶解し TLC に供した。

寒天培地上の阻止円は、保持係数 (Retention factor、Rf 値) として同定した。

$$\text{Rf 値} = \text{阻止円の移動距離} / \text{溶媒の移動距離}$$

(1 1) 統計処理

相関係数は、マイクロソフト・オフィス・エクセル 2003 で解析された。

実験結果

(1) マウス血清を添加した MIC 測定法の確立

抗真菌薬の *in vivo* 効果を予測できる MIC 測定系の構築のために、感染モデルにおける感染部位の環境を模倣したマウス血清を添加した培地において、良好に *C. albicans* の菌糸発育を誘導する新しい培養系を確立した (図 1-1)。そして病原体の病原性に着目した判定基準を設定するために菌糸型細胞の伸長に対する抗真菌活性の判定基準を設定した。具体的には、予め採取したマウス血清を非働化しその 1/100 量の pH 緩衝剤の添加と試験菌の接種を行い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。5% CO₂ は、血中 MIC や sub-MIC を再現性良く判定するために必要な量の菌糸発育を誘導するために必要とされた。*C. albicans* は酵母型細胞として血清培地に接種され、主として病原性と関連があるとされる菌糸型細胞として増殖した (図 1-1)。したがって、本系では酵母型から菌糸型細胞への変換と菌糸細胞の伸長過程が評価の対象となる。そして薬物の作用機序によって、菌糸細胞に対する抑制効果が異なった。アゾール系薬は、菌糸型細胞の菌糸伸長に対して強力な抑制効果を示したが、菌体そのものを消失させる (殺菌作用) ことはなく mMIC 以上の濃度でも接種した菌体は存在した (静菌的作用)。したがってアゾール系薬の抗菌力は、菌糸伸長に対する最小抑制濃度を指標 (MIC for mycelial elongation; mMIC) として測定した。一方、殺菌的に作用するアムホテリシン B は試験菌の増殖抑制 (菌体量) を指標として最小濃度 (MIC for microbial growth; gMIC) を測定した。つまり血中 gMIC 以上の濃度では、接種した酵母型細胞も殺菌作用によって消失した。また、溶剤添加の対照群の菌糸発育を基準とした時、その 60% の抑制を示す最小濃度を各々 sub-mMIC と sub-gMIC とした。

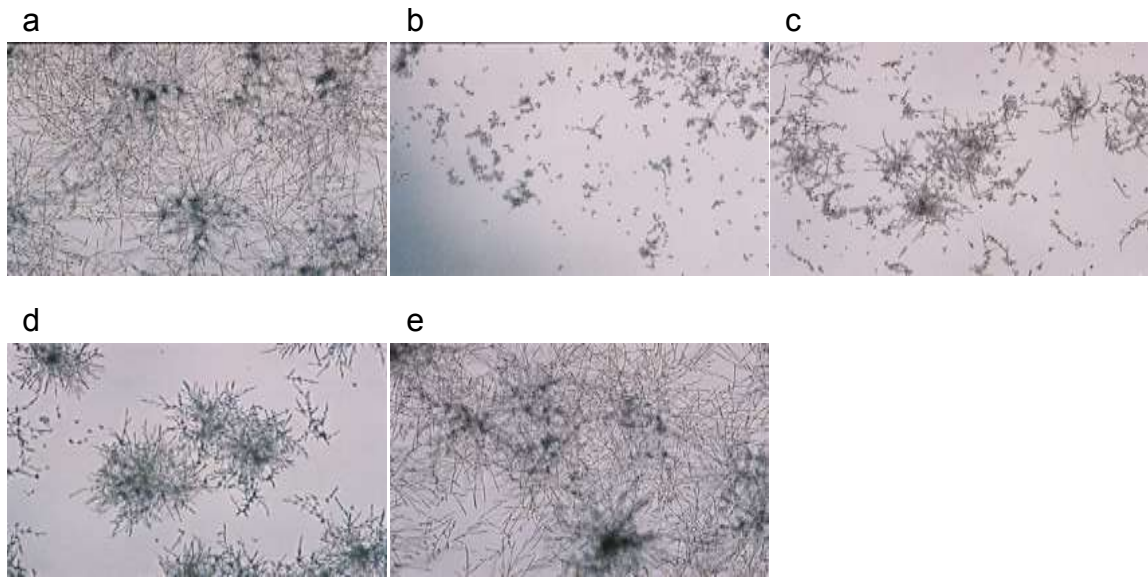


図 1-1 血清添加培地における *C. albicans* の菌糸発育とアゾール系薬の MIC 判定基準

C. albicans ATCC90028 は、20mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 添加マウス血清中で、37℃、5% CO₂ 下で 14 時間培養した。a: 薬物非添加の *C. albicans* ATCC90028 対照群、b-e: フルコナゾールの血中 mMIC と sub-mMIC の判定基準を示す。b: (–) 0.5 µg/mL (mMIC)、c: (+) 0.25 µg/mL、d: (+) ~ (++) 0.125 µg/mL (sub-mMIC)、e: (+++) 0.0625 µg/mL

一方、元来菌糸型細胞として増殖する *A. fumigatus* に対しても *C. albicans* と同様のコンセプトで血清添加の MIC 測定系を確立した (図 1-2)。この培養系においても、分生子として接種された *A. fumigatus* が菌糸型細胞として出芽し伸長する過程が評価の対象となる。ただし *A. fumigatus* の増殖には、*C. albicans* に比べて時間を要するため、培養時間を 20 時間とした。今回検討したアゾール系薬やアムホテリシン B は、*A. fumigatus* に対しては殺菌的に作用するため、MIC 判定は gMIC と sub-gMIC を判定基準とした。

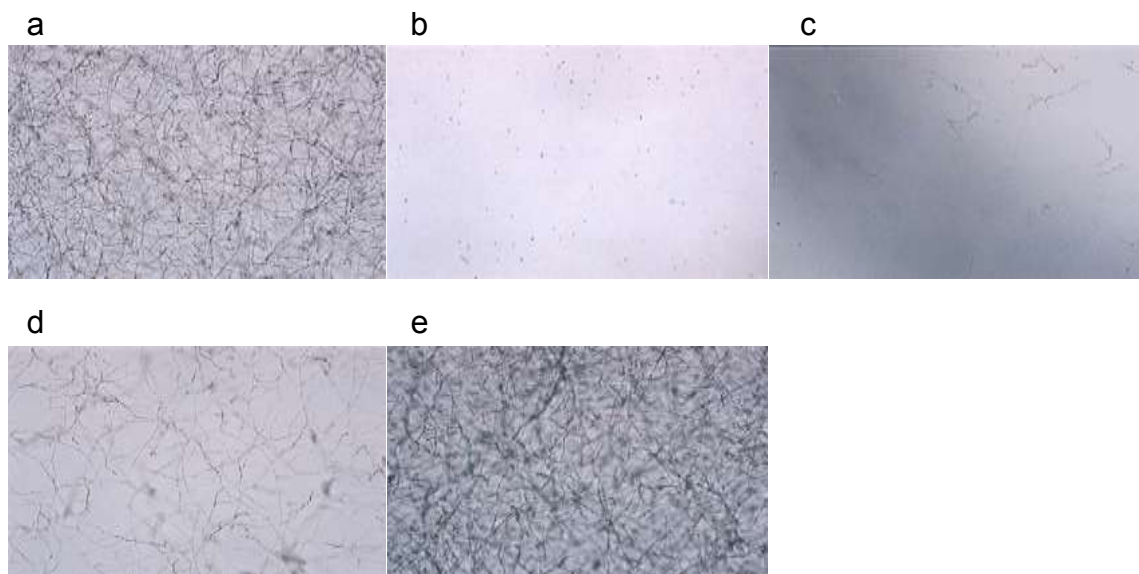


図 1-2 血清添加培地における *A. fumigatus* の菌糸発育とイトラコナゾールの MIC 判定基準

A. fumigatus TIMM0063 は、20mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 添加マウス血清中で、37℃、5% CO₂ 下で 20 時間培養された。a : 薬物非添加の *A. fumigatus* TIMM0063 対照群、b-e : イトラコナゾールの血中 MIC と sub-MIC の判定基準を示す。b : (－) 8 µg/mL (mMIC)、c : (+) 4 µg/mL、d : (++) 2 µg/mL (sub-MIC)、e : (+++) 1 µg/mL

次に、アゾール系薬とアムホテリシン B の *C. albicans* ATCC90028 と *A. fumigatus* TIMM0063 に対する抗菌力を示す (表 1-1)。標準法である血清非添加の CLSI M27-A2 法 (17) による MIC と比較した。

表 1-1 *C. albicans* ATCC90028 と *A. fumigatus* TIMM0063 に対する抗真菌薬の *in vitro* 活性

	(μg/mL)				
	<i>C. albicans</i> ATCC90028			<i>A. fumigatus</i> TIMM0063	
	血清 ^a		RPMI ^b	血清 ^c	RPMI ^d
	MIC	mMIC ^e	gMIC ^f	gMIC ^f	gMIC ^f
フルコナゾール	ND ^g	0.5	0.25	>64	>64
イトラコナゾール	ND	1.0	0.0313	8	1
アムホテリシン B	0.5	ND	0.5	0.5	1

a) HEPES-NaOH (pH7.4) を添加したマウス血清中で 37℃、5% CO₂ 下で 14 時間培養

b) CLSI 推奨法 (一部改変) : MOPS-NaOH (pH 7.0) を添加した RPMI 1640 培地中で 35℃、24 時間培養

c) HEPES-NaOH (pH7.4) を添加したマウス血清中で 37℃、5% CO₂ 下で 20 時間培養

d) CLSI 推奨法 (一部改変) : MOPS-NaOH (pH 7.0) を添加した RPMI 1640 培地中で 35℃、48 時間培養

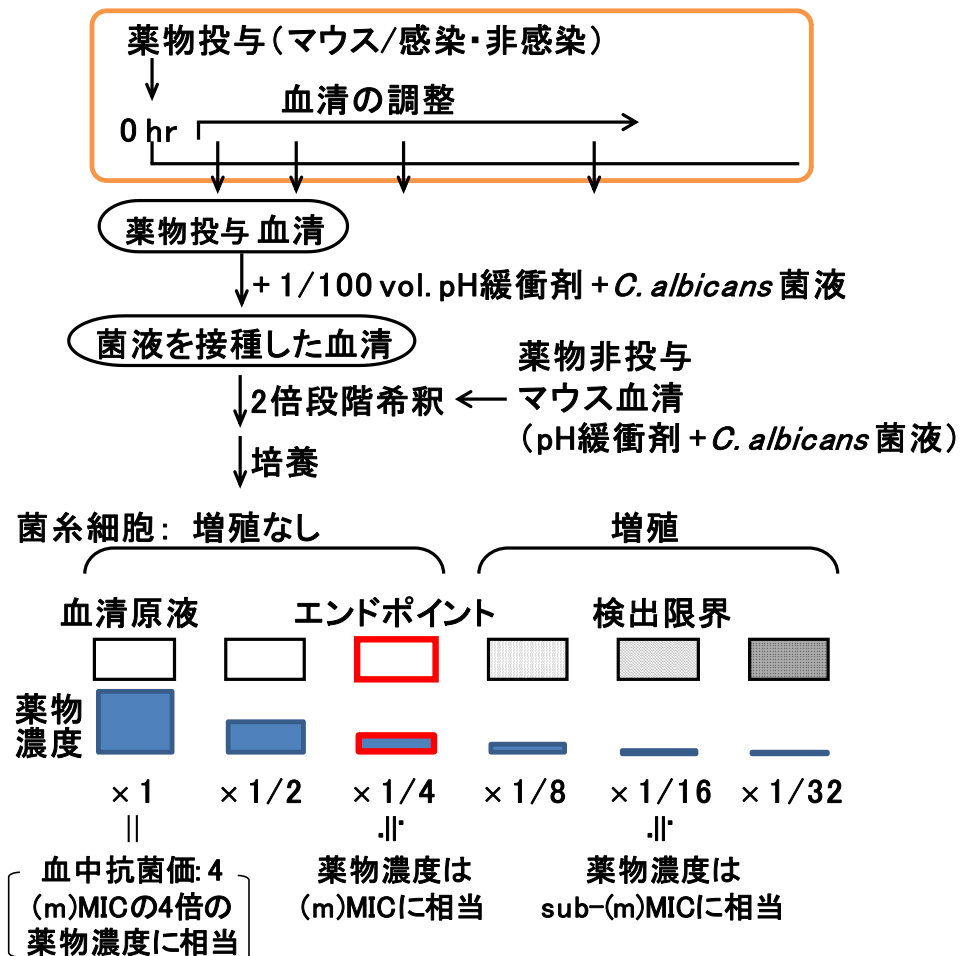
e) 菌糸伸長抑制効果

f) 菌体増殖抑制効果

g) Not determined (判定対象外)

(2) 血中抗菌価による薬物投与後の血中濃度の測定原理

生体内の血清中の薬物量を抗真菌活性として定量するために、血中 MIC の測定原理に基づいた *ex vivo* アッセイ法を検討した (図 1-3)。



$$\text{薬物の血中濃度} = \text{血中抗菌価} \times \text{血中 MIC (mMIC または gMIC)}$$

図 1-3 *Ex vivo* アッセイによる血清中の薬物濃度の推定法

Ex vivo アッセイによって求められる血中抗菌価と血中 MIC の関係を示す。薬物を投与したマウスから採取した血清に、試験菌 (*C. albicans* または *A. fumigatus*) と 20 mM HEPES-NaOH (pH7.4) を添加し限界希釈法の原理で血清に含まれる抗真菌活性を測定した。予め調整されたマウス血清に HEPES-NaOH (pH7.4) と試験菌を添加して希釈液とし、薬物を投与したマウスから採取した血清を血清希釈液で 2 倍段階希釈する。この時血清中の抗真菌活性は希釈されるが、血清培地 (試験菌や血清成分) は希釈されない。血中 MIC (mMIC や gMIC) と同じ判定基準に従って試験菌の増殖を抑制する最大希釈度の逆数を血中抗菌価と定義した。この *ex vivo* アッセイのエンドポイントは血中 MIC (mMIC または gMIC) に相当するため、血中抗菌価と血中 MIC の積は薬物濃度として求められる。

薬物を投与したマウスから経時的に調整した血清に、血中 MIC 測定方法に従って緩衝剤と試験菌のみを添加し、同じく緩衝剤と試験菌を含むマウス血清を希釈液として 2 倍段階希釈系列を作成した (図 1-3)。限界希釈法に従い mMIC や gMIC と同じ判定基準の抗真菌活性を検出できる最大希釈度を求めて、その逆数を血中抗菌価とした。この血清サンプルの最大希釈度が血中 MIC (mMIC または gMIC) に相当し血中抗菌価が 1 の時の薬物濃度は mMIC や gMIC と同等とみなされ、薬物を投与したマウス由来の血清における抗真菌活性の検出限界は各々 sub-mMIC と sub-gMIC とする。そしてマウスから採取した血液中の薬物濃度は、以下のように血中抗菌価と血中 MIC から得た mMIC あるいは gMIC との積として推定される。

(3) 血中抗菌価法と HPLC 法によるイトラコナゾールの血中濃度の乖離

試験菌として *C. albicans* と *A. fumigatus* を用いて血中抗菌価と血中 MIC (mMIC または gMIC) から薬物の血中濃度を推定した (図 1-4, 1-5)。

フルコナゾールとアムホテリシン B では、血中抗菌価や HPLC 法で求めた血中濃度は良好に相関性した (図 1-4、図 1-5)。しかしながらイトラコナゾールについて、*C. albicans* を試験菌とした血中抗菌価法では体内動態パラメーターの方が HPLC 法で求めた値よりも、投与後の最高血中濃度 (Cmax) で約 3.3 倍、そして血中薬物濃度-時間曲線下面積 (area under the serum concentration vs. time curve; AUC_{0-∞}) で約 4.8 倍大きかった (図 1-4、表 1-2)。また図 1-5 に示すように *A. fumigatus* を試験菌とした場合もアムホテリシン B とイトラコナゾールの相関性は低く、抗菌価から求めた Cmax と AUC_{0-∞}値は HPLC 法よりも約 2 倍大きかった (表 1-2)。さらに投与後 Cmax に到達する時間 (Tmax) も、両試験菌による血中抗菌価法の方が遅かった。

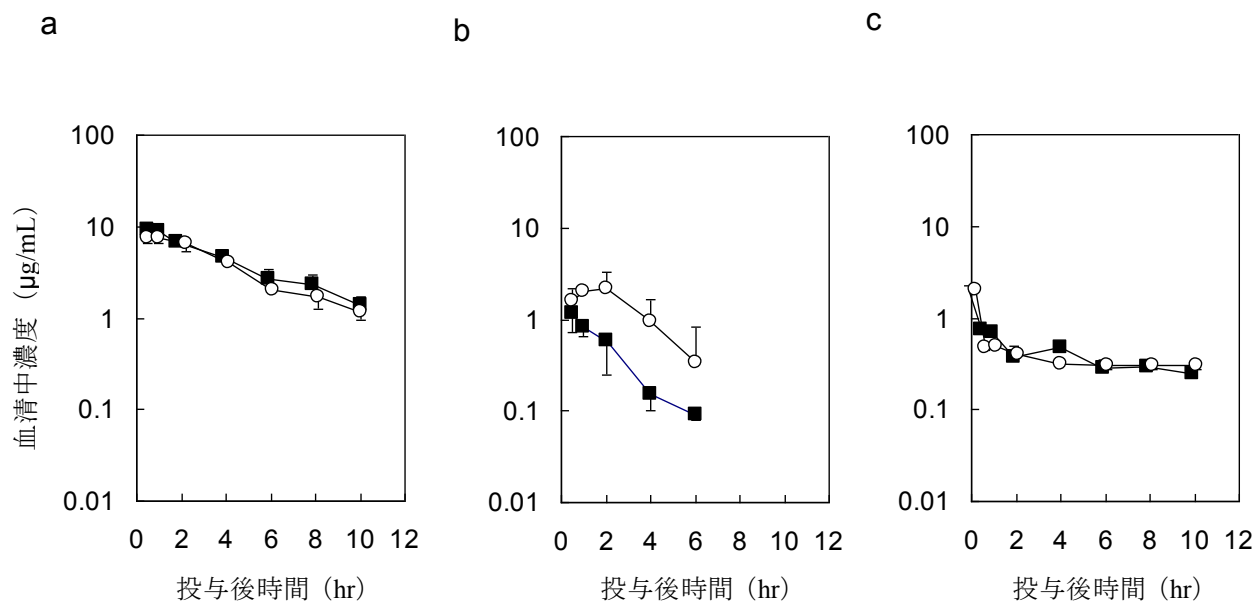


図 1-4 アゾール系薬とアムホテリシン B の *C. albicans* を試験菌とした血中抗菌価法と HPLC 法により求めた血清中濃度の比較

血中抗菌価法では、血清中の薬物濃度を血中抗菌価と血中 MIC (mMIC または gMIC) の積から推定した。非感染 Slc:ICR マウスにアゾール系薬 (10 mg/kg) を経口投与しアムホテリシン B (1 mg/kg) は尾静脈投与した。○: 血中抗菌価法、■: HPLC 法 a: フルコナゾール ($r^2 = 0.98$)、b: イトラコナゾール ($r^2 = 0.49$)、c: アムホテリシン B ($r^2 = 0.96$) 各測定点は、平均±標準偏差を示す (n = 5)。

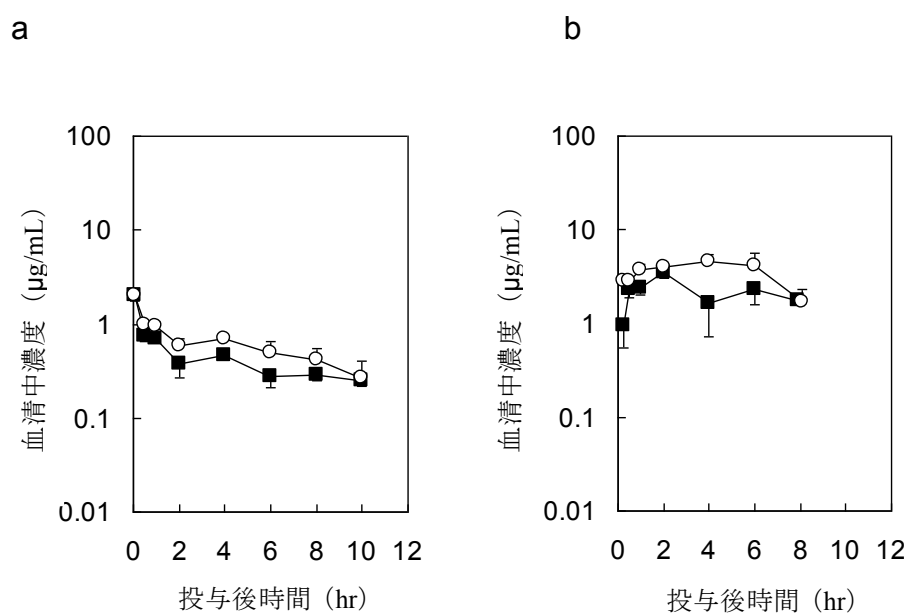


図 1-5 アムホテリシン B とイトラコナゾールの *A. fumigatus* を試験菌とした血中
抗菌価法と HPLC 法により求めた血清中濃度の比較

血中抗菌価法では、血清中の薬物濃度を血中抗菌価と血中 gMIC との積から推定した。非感染Slc:ICRマウスにアムホテリシン B (1 mg/kg) は尾静脈投与しイトラコナゾール (100 mg/kg) は経口投与した。○：血中抗菌価法、■：HPLC 法 a：アムホテリシン B ($r^2 = 0.97$) b：イトラコナゾール ($r^2 = 0.46$) 各測定点は、平均±標準偏差を示す(n = 5)。

表 1-2 イトラコナゾールの体内動態パラメーター。

用量 ^a	測定法	Cmax ^b	t _{1/2} ^b	Tmax ^b	AUC _{0-∞} ^b
10	HPLC	0.64	0.74	≤0.5	1.8
	<i>C. albicans</i> ATCC90028 ^c	2.1	1.1	1.5	8.7
100	HPLC	2.7	3.4	0.81	19.0
	<i>A. fumigatus</i> TIMM0063 ^c	5.3	1.8	2.4	34.8

a) mg/kg

b) Cmax : μg/mL、t_{1/2} : hr、AUC_{0-∞} : hr・μg/mL

c) 表示された試験菌を用いて血中 MIC (mMIC または gMIC) と血中抗菌価の積から推定された。

(4) イトラコナゾールの血中濃度の乖離の原因探索

バイオオートグラフィー系の確立

イトラコナゾールの血中抗菌価法と HPLC 法による血中濃度の乖離が活性代謝物であると想定し、マウスから採取した血清抽出物を薄層クロマトグラフィーで分離して寒天培地上で抗真菌物質を検出するバイオオートグラフィーを検討した。*C. albicans* の場合、アゾール系薬は菌糸型細胞に対して強力な伸長効果を有することに着目した。菌糸型細胞を誘導する人工培地(16)を利用したが検出感度が不十分であったため(図 1-6A)、さらに感度を向上させる必要があった。イトラコナゾールを浸み込ませたペーパーディスクを試験菌を含む寒天培地上に置き、倒立顕微鏡で観察すると、増殖を完全阻止されない細胞でも細胞表面が歪み、薬物の抗真菌活性の影響を受けていることがわかった(データー非表示)。そこで何らかの発育阻止効果との協力作用により、この歪んだ細胞を選択的に殺菌させることができると考えた。種々の併用試薬を検討した結果、この培養系に 0.014 %という低濃度の陰イオン性界面活性剤(SDS)を添加すると歪んだ形態を示す菌が選択的に死滅し明瞭な阻止円が形成され、検出感度を約 100 倍向上できることを見出した(図 1-6A)。同様に、*A. fumigatus* の場合は、2 種の界面活性剤が有効で 0.01% SDS と 0.001% Tween 80 の組み合わせが最適であった(図 1-7A)。これら界面活性剤の最適濃度幅は厳格で、0.002–0.003%おきに作用濃度を検討する必要があった。

バイオオートグラフィーによるイトラコナゾールの活性代謝物の検出

イトラコナゾールを投与したマウスから経時的(薬物投与 2, 6 および 14 時間後)に採取した血清の抽出物を薄層クロマトグラフィー(TLC)法で分離し、界面活性剤を含む寒天培地上で活性体を検出するバイオオートグラフィーに供した。*C. albicans* と *A. fumigatus* を試験菌とした場合、イトラコナゾール標準品よりも移動度の小さい位置に抗真菌活性を有する物質が存在することが明らかとなった(図 1-6B、1-7B)。それぞれの試験菌に対する増殖阻止円の保持時間(R_f 値)は、*C. albicans* を試験菌と

した場合、標準品：Rf = 0.57、標準品以外の増殖阻止円：Rf = 0.43、*A. fumigatus* を試験菌とした場合、標準品：Rf = 0.56、標準品以外の増殖阻止円：Rf = 0.42 であった。この原体以外の増殖阻止円は、原体の阻止円が検出限界以下に達した投与 14 時間後でも検出された。また、この原体とは異なる増殖阻止円は、溶剤を投与した対照マウスの血清抽出物やイトラコナゾール標準品とのダブルスポットにより影響されなかった。

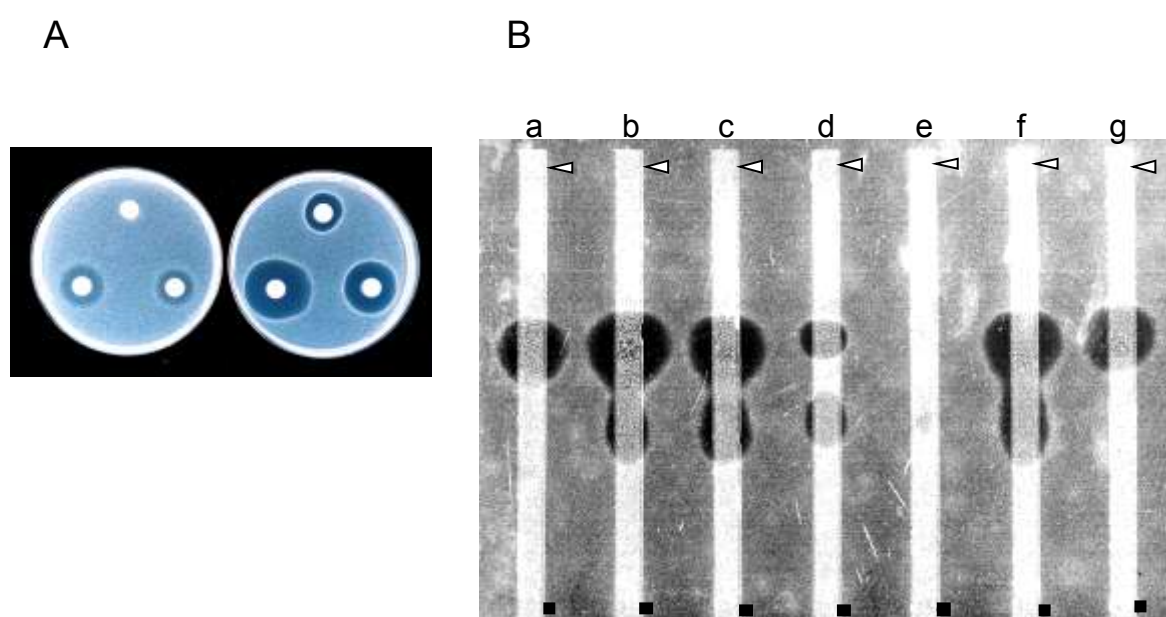


図1-6 イトラコナゾールを投与したマウスから採取した血清サンプルの *C. albicans* を試験菌としたバイオオートグラフィ

A：イトラコナゾールの *C. albicans* 増殖抑制効果による阻止円形成に対する SDS の効果
 左シャーレ：SDS 非添加、右シャーレ：0.014% SDS 添加 シャーレ内のイトラコナゾールのペーパーディスク濃度：左；100 $\mu\text{g/mL}$ 、右；10 $\mu\text{g/mL}$ 、中央；1 $\mu\text{g/mL}$ B：イトラコナゾールを投与マウスから採取した血清中の活性物質の検出 イトラコナゾール(20 mg/kg)をSlc-ICRマウスに尾静脈内投与し経時的に血液を採取した。血液から調整した血清は、メタノールで抽出しバイオオートグラフィに供した。a：イトラコナゾール標準品 (0.3 μg)、b：投与後 0.5 時間の血清サンプルの抽出物、c：投与後 2 時間、d：投与後 6 時間、e：投与後 14 時間、f：イトラコナゾール標準品 (0.3 μg) と投与後 6 時間の血清サンプルの抽出物の混合物、g：イトラコナゾール標準品 (0.3 μg) と投与溶剤を投与したマウスから採取した血清の抽出物の混合物 ■：原点、矢尻：溶媒先端

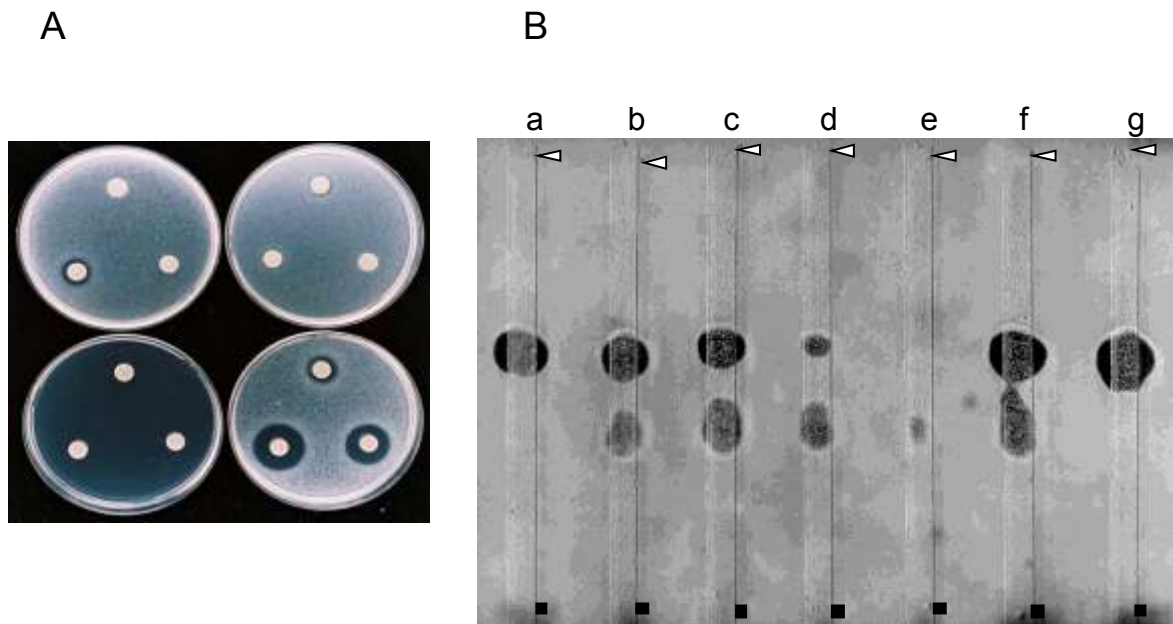


図1-7 イトラコナゾールを投与したマウスから採取した血清サンプルの *A. fumigatus* を試験菌としたバイオオートグラフィ

A : イトラコナゾールの阻止円形成に対する界面活性剤 (SDS と Tween 80) の効果 左上シャーレ : 界面活性剤非添加、右上シャーレ : 0.001% Tween 80 添加、左下シャーレ : 0.01 % SDS 添加、右下シャーレ : 0.01 % SDS と 0.001 % Tween 80 添加 シャーレ内のイトラコナゾールのペーパーディスク濃度 : 左 ; 100 $\mu\text{g/mL}$ 、右 ; 10 $\mu\text{g/mL}$ 、中央 ; 1 $\mu\text{g/mL}$ B : イトラコナゾール投与マウスから採取した血清中の活性代謝物の検出 イトラコナゾール (100 mg/kg) を Slc-ICR マウスに経口投与し経時的に血清を調整した。マウスから調整した血清は、メタノールで抽出しバイオオートグラフィに供した。a : イトラコナゾール標準品 (1 μg)、b : 投与後 0.5 時間の血清サンプルの抽出物、c : 投与後 2 時間、d : 投与後 6 時間、e : 投与後 14 時間、f : イトラコナゾール標準品 (1 μg) と投与後 6 時間の血清サンプルの抽出物の混合物、g : イトラコナゾール標準品 (0.3 μg) と投与溶剤を投与したマウスから採取した血清の抽出物の混合物 ■ : 原点、矢尻 : 溶媒先端

考察

抗真菌薬の *in vivo* 効果を予測できる *in vitro* 評価系の構築のために、*C. albicans* と *A. fumigatus* に対する血清を添加した新しい *in vitro* 感受性測定法を確立した。この測定系の原理は、生体の感染部位を模倣し病原体の病原性を指標とした評価基準を設定することである。この系では、*C. albicans* は血清培地に接種された酵母細胞の菌糸型細胞への変換と菌糸伸長過程が評価の対象となる。また *A. fumigatus* は、接種された分生子が菌糸細胞として出芽し伸長する過程が対象である。これまでの抗真菌薬の感受性測定法は、臨床診断の実務上の利便性から人工培地上で病原体の増殖が肉眼で判定できるほど大量に増殖させることもあり (17-19)、抗真菌薬の *in vivo* 効果を反映しないことが創薬や薬物動態学/動力学 (PK/PD) 解析上の課題と考えた。たとえば二形成真菌の *C. albicans* の場合、酵母型細胞よりも菌糸型細胞の方が病原性との関連性が強い傾向があること、そして外部環境により細胞の形態形成が変化することが知られていた (15)。このような知見から、外部因子に応答した細胞内の転写系が形態形成を誘導し抗真菌薬の抗微生物効果にも影響を与えると仮説を立てた。つまり感染部位の生体因子の影響により真菌細胞内の環境が変化し *in vivo* 固有の MIC が存在するだろうと推察した。

生体環境を模倣するために検討した血清の由来動物種やその添加濃度によっても、細胞の形態形成に相違が認められたことから、外部因子の影響は厳格で多彩であると考えられた。そこで生体内における感染部位を正確に模倣するために、感染モデルと同じ動物種のマウス血清を用いて可能な限り希釈しない培養系を確立した。この培養系では *C. albicans* はその病原性と関連が深い菌糸型細胞として生育するため、病原性の発現抑制を指標とした感受性測定系の意義も包含した。また抗真菌薬の真菌細胞の形態への作用は、機序と菌種の組み合わせによって変化した。たとえば、アゾール系薬は、*C. albicans* に対して静菌的で酵母型への抑制効果は軽微であるが、菌糸発育抑制は強力である (非公表データ、図 1-1、14, 16)。

アムホテリシン B は *C. albicans* に対する作用やイトラコナゾールの *A. fumigatus* に対する作用は殺菌的である。このような種々の作用に対応するため、mMIC や gMIC の評価基準を設定した。

このような経緯から以下のコンセプトで新しい *in vitro* 評価法を確立することにした。

- ①感染部位を模倣するために高濃度血清を用いる培養系
- ②病原体の病原性に着目し各薬物の作用機序に合わせた判定基準

さらに、生体を循環する薬物の抗真菌活性の測定系として、血中 MIC 法と同じ判定基準を有する *ex vivo* アッセイ系を確立し、血中抗菌価として薬物濃度を定量した。血中抗菌価はマウスから採取した血清中の薬物濃度を血中 MIC や sub-MIC に換算することができる。この *ex vivo* アッセイでは、血清原液を希釈しないため、薬物濃度が sub-MIC 付近にあっても試験菌に対する作用を抗真菌活性として測定できる。そして同一個体の血清中における抗真菌活性と *in vivo* 効果（腎内生菌数に対する抑制効果）を経時的に比較できる利点がある。

これらの測定原理に基づいて *C. albicans* と *A. fumigatus* を試験菌とした *ex vivo* アッセイ法を用いて、フルコナゾールやアムホテリシン B の血清中薬物濃度の測定が可能であった。このアッセイ系で定量した抗真菌活性が、*in vivo* 効果を反映するかどうか、今後の課題となる。

一方、イトラコナゾールの血中濃度は、HPLC 法と *ex vivo* アッセイによる測定値に乖離が認められた。この乖離の原因は、薬物投与後の経時的な高感度バイオオートグラフィーの結果から、以下の根拠でイトラコナゾールはマウスにおいて活性代謝物を産生すると結論付けられた。

- ① 血中抗菌価アッセイで求めた AUC は、HPLC 法で求めた値より約 2-4.8 倍大きかった。
- ② バイオオートグラフィー法において、イトラコナゾール原体以外の試験菌に対

する増殖阻止円を検出した。

- ③ 原体とは異なる阻止円は、原体の阻止円よりも長時間にわたって阻止円が検出された。
- ④ 原体とは異なる増殖阻止円は、溶剤を投与したマウスの血清抽出物やイトラコナゾール標準品とのダブルスポットにより TLC 上の移動が影響されなかった。

上記の理由から、標準品とは異なる増殖阻止円はイトラコナゾール自体の TLC 展開時の分離物ではないと考えられ、イトラコナゾールから産生されたと考えられる活性体を検出した。今回マウスを宿主として検出された活性代謝物がヒトで同定されているヒドロキシイトラコナゾール (24, 25, 26) かどうかは不明である。しかしながら、血中抗菌価と高感度バイオオートグラフィーは、アゾール系薬のラベル体を使用しなくても活性代謝物を検出できる点で抗真菌剤のスクリーニングの初期段階で有用であった。

これらの結果から、血中抗菌価はマウス血清中の抗真菌活性物質の *ex vivo* 検出系として、*in vitro* 抗菌力と *in vivo* 薬効の乖離を説明する手段として期待された。

(第二章) 血中抗菌価と *in vivo* 効果との相関性と薬動学的解析

前項において、HPLC 法との比較から血中抗菌価が投与後の血清中の抗真菌活性を正確に検出していることが示された。次に血中抗菌価を利用して、抗真菌薬のマウス血中 MIC と *C. albicans* 感染マウスモデルにおける *in vivo* 効果との関係を検証した。イトラコナゾールはマウスにおいて活性代謝物が産生されるため、原体と活性代謝物の抗真菌活性を含む血中抗菌価で解析することが適切であった。

試験菌株は CLSI 法の参照株として指定されている *C. albicans* ATCC90028 株を用いた。宿主は *C. albicans* に対して感受性の高い C5-補体欠損の DBA/2 マウスを *in vivo* 感染系の宿主とした。*C. albicans* の酵母型細胞を静脈内接種1時間後に薬物治療した。

また *in vitro* と *in vivo* 活性の測定条件の相違による乖離を最小限に留めるため、以下のように実験条件を設定した。

- ① *C. albicans* は酵母型としてマウスへ接種され、菌糸型細胞へ形態変化し菌糸伸長する過程を抗真菌薬の評価の対象とする。この過程は血中 MIC 測定系も評価対象としている。
- ② *in vitro* では酵母から菌糸型の変換は数時間を要することから、菌体を接種した1時間後に薬物が投与される *in vivo* 試験では大部分の菌体は血管内空に存在していると考えられ、薬物が病原体に作用する部位は、*in vitro* 同様に血流中の可溶性画分と想定された。

これらを前提としてマウスに静脈接種された *C. albicans* は腎に集積するが、延命効果と相関する薬物の腎内生菌数に対する抑制効果を *in vivo* 有効性の指標とした。

血清添加アッセイの検証のために、作用機序や毒性作用が明らかで有効性が証明されている既存薬物を対象とした。そして *in vivo* の薬効に影響する性質が特徴的な3つのアゾール系薬、つまりフルコナゾール、イトラコナゾールとケトコナゾールを用い、そしてポリエン系薬としてアムホテリシン B を使用した。

(参照データ) 抗真菌薬の *in vivo* 効果に影響する因子 (ヒト)

	<i>C.albicans</i> に対する作用	蛋白 結合率	投与量	AUC ^a	t _{1/2β}	C _{max}	活性 代謝物
フルコナゾール ^b		11	1mg/kg ^c	42	22	1.4	なし ^d
イトラコナゾール ^b	静菌的	99.8	100mg ^e	1.9 (0.7)	17	0.132	あり ^f
ケトコナゾール ^b		99	200 mg ^g	12.9 (13.6)	8.1	3.29	なし ^d
アムホテリシン B ^h	殺菌的	>95 ⁱ 濃度 依存的	1mg/kg ^h	18.0	25.8	1.76	なし ^d

アゾール系薬は内服、アムホテリシン B は注射投与

蛋白結合率：％、AUC：μg・hr/mL、t_{1/2β}：hr、C_{max}：μg/mL

a)接食（絶食）

b)文献 14 を引用

c)文献 27 を引用

d)第一章における検討結果を引用

e)文献 28 を引用

f)文献 24, 25, 26 を引用

g)文献 29 を引用

h)文献 30 を引用

i)文献 31 を引用

実験方法

(1) 菌株

本章において *C. albicans* ATCC90028 株を用いた。本菌株は CLSI M27-A2 法 (17) の精度管理株である。*C. albicans* ATCC90028 株は、サブローデキストロース斜面寒天培地 (2% グルコース、1% ポリペプトン、1.5% 寒天、SDA) で 30℃で 2 日間培養し、その後室温で維持された。種菌は 1 ヶ月に 1 度凍結ストックから更新され斜面寒天培地を作成した。

(2) 試薬

フルコナゾールはジフルカンとしてファイザーから購入され、イトラコナゾールはイトリゾール (ヤンセンファーマ) から抽出・精製された。アムホテリシン B は、ファンギゾンとしてブリストルマイヤースクイブ社から購入された。*in vitro* 試験のために、フルコナゾールとアムホテリシン B はイオン交換水に、イトラコナゾールは、10% ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解された。

(3) RPMI MIC 測定

前項に示したように CLSI M27-A2 法 (17) に準じて、RPMI 1640 培地中の抗菌力を測定した。水酸化ナトリウム (NaOH) で pH 7.0 に調整した 165 mM 3-*N*-morpholino-*o*-propanesulfonic acid (シグマ アルドリッチ ジャパン 株式会社、東京、MOPS) を添加した RPMI 1640 培地 (RPMI 培地) を使用した。適当に溶解させた薬物を RPMI 培地で希釈し、128 µg/ml に調整した。この 100 µL の薬液 (128 µg/ml) を 96 穴マイクロプレート (住友ベークライト、東京) において、RPMI 培地を使用して 2 倍段階希釈した。このようにして作成した希釈系列に RPMI 培地で調整した 100 µL の菌液を添加した (菌終濃度: 約 10^3 cfu/mL)。このマイクロプレートを 35℃、24 時間培養し、80 %の増殖抑制を示す最小濃度を MIC (RPMI MIC) とした。

(4) 血中 MIC

感染宿主である DBA/2 マウス (先天的な補体 C5 欠損、6 週令、日本エスエルシー、静岡) から採取した血清を、培養液として用いるため 1 章と同様の手法で調整した。DBA/2 マウス由来血清は、非働化 (56.5°C、30 分) し、0.22 μm 径 ミリポアフィルター (日本ミリポア、東京) で濾過し、-80°C で保存した。アッセイ時にマウス血清を希釈しないように非働化マウス血清に 1/100 量の NaOH で pH 7.4 に調整された 2M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (同仁化学研究所、熊本、HEPES-NaOH) と 1/100 量の *C. albicans* 1×10^6 cfu/mL を添加し血清培地とした。血清培地で適当に希釈した薬物溶液 (64 $\mu\text{g/mL}$) をマイクロプレート上で血清培地で希釈し、2 倍段階希釈系列を作成した。このプレートを 37°C、5 % CO_2 下で 14 時間培養した。*C. albicans* の菌糸伸長に対する抑制効果を倒立顕微鏡 (IX70、オリンパス株式会社、東京) を用いて以下の基準で観察した。+++ : 溶剤添加群と同程度の増殖、++ : 約 60 % 以下の増殖抑制、+ : 約 30 % 以下の増殖抑制、± : 菌糸伸長抑制、- : 出芽抑制もしくは菌の消失。アゾール系薬の場合、mMIC は、薬物が ± ~ - の抑制効果を示す最小濃度とした。また、++ の抑制効果を示す最小濃度を sub-mMIC とした。アムホテリシン B では、- の抗菌力を示す最小濃度を gMIC とし、++ の抑制効果を示す最小濃度を sub-gMIC とした。

(5) 薬物投与

フルコナゾールとケトコナゾールは粉末を、イトリゾール顆粒は破碎した後、0.5 % メチルセルロース (和光純薬工業、大阪) に懸濁し、ゾンデを用いてマウス (5 週令) に経口投与した。アムホテリシン B は 5 % グルコース溶液に溶解し静脈内投与した。体内動態試験では、薬物投与一定時間後に投与マウスを安楽死後、心臓採血により血液を採取し血清を分離した。

(6) *ex vivo* アッセイによる血中抗菌価測定と薬物濃度の推定

血清サンプルの抗真菌活性は、*ex vivo* アッセイの限界希釈法により抗菌力が検出される最大の希釈度から求められた。薬物を投与したマウスから経時的に血清を採取し、血中 MIC 測定時と同様の手順で、1/100 量の HEPES-NaOH (pH 7.4) と 1×10^6 cfu/ml の *C. albicans* をそれぞれ混合し、マイクロプレートに 200 μ L を添加した。これを 100 μ L の血清培地で 2 倍段階で希釈系列を作成し、37°C、5 % CO₂ 下で 14 時間培養した。培養後倒立顕微鏡観察により血清添加の抗真菌活性 (MIC) 測定時の mMIC や gMIC の抗菌力を維持する最大希釈度を求め、その逆数を血中抗菌価とした。血中抗菌価を決定した最大希釈度のウェルは血中 mMIC や gMIC とほぼ同等の濃度に相当し、血中抗菌価と血中 mMIC や gMIC の積はその時点の薬物濃度として推定できる。マウス由来血清の抗菌価が 1 以下の時は、MIC 判定法に準じて以下のように抗菌価を決定し、グラフ上に表記した。+++ (溶剤添加群と同程度の増殖) : 0.1、++ (sub-mMIC または sub-gMIC、約 60 %以下の増殖抑制) : 0.25、+ (約 30 %以下の増殖抑制) : 0.5、± (菌糸伸長抑制) または - (出芽抑制もしくは菌の消失) : 1 (mMIC または gMIC)。また、マウス由来血清における抗真菌活性が sub-mMIC や sub-gMIC に相当する++の抑制効果を示す場合を抗菌価の検出限界と定義した。

(7) 感染モデルにおける延命効果

C. albicans ATCC90028 株を DBA/2 マウスに尾静脈接種し (約 3×10^4 cfu/マウス)、1 時間後に薬物を投与した (10 匹/群)。化合物の代わりに生理食塩水を投与した対照群が全例死亡した日を延命効果の判定日とした。この薬物の延命効果から、プロビット法を用いて 50%ならびに 90%の延命効果に必要な用量として exp. ED₅₀ と exp. ED₉₀ 値が求められた。

(8) 感染モデルにおける血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果

上記と同様の条件で DBA/2 マウスに *C. albicans* ATCC90028 を尾静脈内接種し、1

時間後に薬物を投与した（4 匹/群）。その後、経時的にマウスを安楽死させ、血清を採取し腎臓を摘出した。血清については、血中抗菌価を測定した。腎臓は、腎内生菌数を測定し薬物の抗菌力を評価した。

（9）最小用量（ED₉₀）のアゾール系薬を投与した時の血中抗菌価

DBA/2 マウスに *C. albicans* ATCC90028 を尾静脈接種し、1 時間後に（グラフ上の 0 time）ED₉₀ 用量のアゾール系薬（フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール）を投与した（4 匹/群）。その後、2 時間毎にマウスを安楽死させ血清を採取し、上記と同様の方法で血中抗菌価を測定した。

（10）血中抗菌価－時間曲線から求めた体内動態パラメーター

最小有効濃度に基づいた薬動学的解析では、薬物濃度は血中抗菌価に代えて検討した。

薬物の体内動態パラメーターは、1-コンパートメント・モデルに従って算出された。

$$C = C^0 \cdot \exp(-K \cdot t)$$

C : 時間 t における薬物濃度、 K : 消失速度定数、 C^0 : 0 time における薬物濃度（外挿値）

薬物濃度が血中 mMIC や sub-mMIC を維持する時間は、上記の計算式から求められた。AUC は血中抗菌価－時間曲線において、薬物が効果を発揮しない血中 sub-mMIC 以下の面積を除外して台形ルールに基づいて算出された。したがって、本章の薬動力学解析において求める AUC は菌糸発育抑制効果を有する薬物の濃度－時間曲線からなる面積である。

(11) 統計解析

血中抗菌価－腎内静菌数曲線における相関関係は、GraphPad Prism（米国）の two-phase decay 式を用いて相関性を検証した。また、AUC と薬効の相関性は、Mann-Whitney U test（GraphPad Prism）に従って検証され、P 値<0.05 を優位差ありと判定した。

実験結果

1. 抗真菌薬投与後の血中抗菌価と *in vivo* 効果との関係

(1) 抗真菌薬の活性プロファイル

表 2-1-1 は本章で用いる薬物の *C. albicans* に対する薬理活性を示す。抗真菌薬のマウス血清添加時の *in vivo* 抗真菌活性として、アゾール系薬は mMIC、アムホテリシン B は gMIC として測定した。さらに、*in vitro* における抗真菌活性の検出限界として sub-mMIC と sub-gMIC を測定した。また、*in vitro-in vivo* 効果の検証には、致死モデルである播種性 *C. albicans* 感染モデルにおける 50% 延命効果 (ED₅₀) を投与量の基準とした。感染マウスにおける腎内生菌数に対する抑制効果を *in vivo* 効果の指標とした。

表 2-1-1 *C. albicans* ATCC90028 に対する抗真菌活性

	<i>in vitro</i> (μg/mL)				<i>in vivo</i> (mg/kg)		
	血清添加				延命効果		
	mMIC ^a	sub-mMIC ^a	gMIC ^b	sub-gMIC ^b	MIC ^c	ED ₅₀ ^d	ED ₉₀ ^d
フルコナゾール	0.5	0.13	ND	ND	0.25	0.52	0.90
イトラコナゾール	1	0.25	ND	ND	0.0313	4.8	9.9
ケトコナゾール	0.5	0.13	ND	ND	0.0625	17.0	24.3
アムホテリシン B	ND	ND	0.5	0.13	0.5	0.050	ND

a) 菌糸発育抑制効果を指標として血中 MIC または sub-MIC

b) 菌の増殖を指標とした血中 MIC または sub-MIC

c) 改変 CLSI M27-A2 法 (17)

d) 播種性マウス感染モデルにおいて 50 %あるいは 90%の延命効果に必要な用量

ND : Not determined (判定対象外)

(2) 播種性 *C. albicans* 感染マウスにおけるフルコナゾールの血中抗菌価と腎内生菌数の関係

図 2-1-1 は、フルコナゾールの血中抗菌価と腎内静菌数に対する抑制効果を示す。*C. albicans* を静脈内接種 1 時間後に経口投与したフルコナゾールの血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果の関係を検証した。

溶剤投与群において、*C. albicans* の腎内生菌数は接種後 24 時間で 5.0×10^3 cfu から 5.4×10^5 cfu へ約 100 倍菌数は増加した (図 2-1-1 b)。血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果は、以下のような関係が認められた。

① 効果なし濃度域 (sub-mMIC 以下)

$\times 1/3$ ED₅₀ 投与時のフルコナゾールの血中抗菌価は投与 3 時間後には検出できず、その血中濃度は sub-mMIC に到達しなかったが、腎内生菌数に対する抑制効果も示さなかった。

② sub-mMIC 効果 (濃度依存性・部分抑制)

$\times 1$ ED₅₀ 投与群では、血中抗菌価が投与 8 時間まで sub-mMIC 濃度域を推移し腎内生菌数に対しても部分抑制効果を示した。

③ supra-mMIC、mMIC 効果 (濃度非依存性・静菌的)

$\times 3$ ED₅₀ から $\times 30$ ED₅₀ の薬物投与群では 8 時間以上にわたって血中抗菌価は 1 を上回り血中濃度は mMIC 以上を維持していた。これらの用量では腎内生菌数に対する抑制効果は最大に達し投与開始時の菌数を維持し (静菌作用)、その菌数増殖抑制効果に用量依存性や濃度依存性はなかった。

以上、フルコナゾールの血中抗菌価や mMIC は、腎内生菌数に対する抑制効果を反映した。

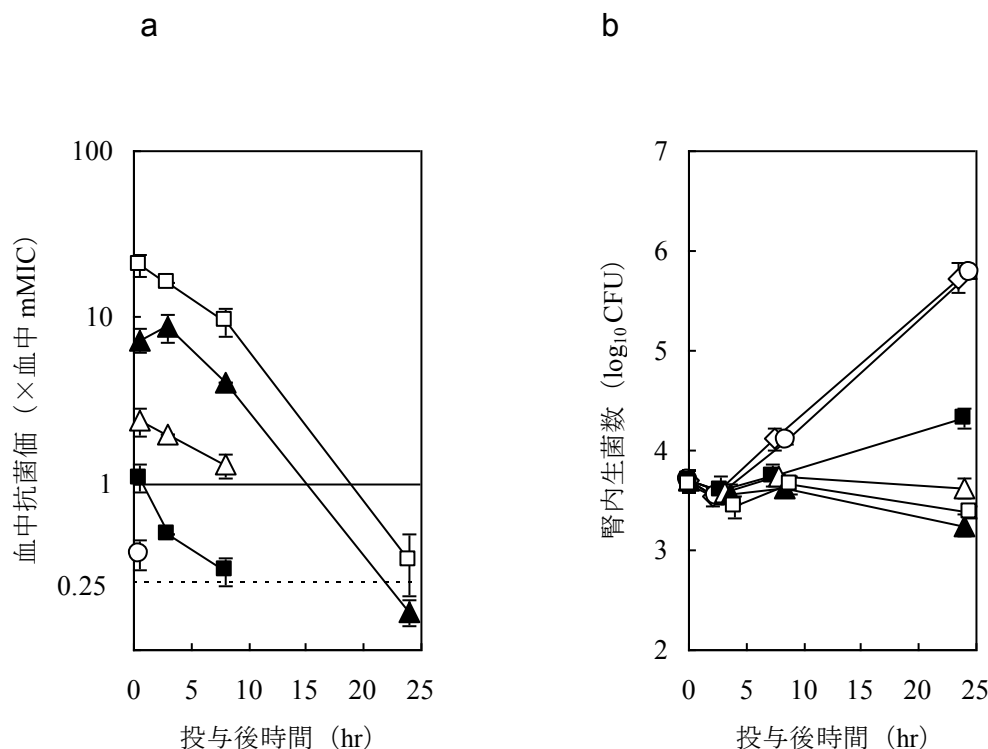


図 2-1-1 フルコナゾールの血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果

DBA/2 マウスに *C. albicans* を接種した 1 時間後にフルコナゾールを経口投与した（グラフ上の 0 時間） ◇：溶剤投与群、○： $\times 1/3$ ED₅₀、■： $\times 1$ ED₅₀、△： $\times 3$ ED₅₀、▲： $\times 10$ ED₅₀、□： $\times 30$ ED₅₀ a：フルコナゾールの血中抗菌価、実線は血中抗菌価 = 1（血中 mMIC に相当）を示す。点線は血中抗菌価 = 0.25（血中 sub-mMIC に相当）を示す。b：フルコナゾール投与感染マウスの腎内生菌数 各データは平均±標準偏差を示す（n=4）。

（3）アゾール系 3 薬物の血中抗菌価と腎内生菌数の同等性

血中抗菌価を用いてアゾール系の薬物間での抗真菌活性の同等性を検証した（図 2-1-2）。同等性とは、薬物間で血中抗菌価が等価の推移を示した時、同等の *in vivo* 効果が発現するということである。マウスに *C. albicans* を静脈内接種した 1 時間後にフルコナゾール、イトラコナゾール、およびケトコナゾールを経口投与し（グラフ上の 0 時間）、8 時間後の血中抗菌価と 24 時間後の腎内生菌数の関係を解析した。その結果、3 薬物の血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果は良好に相関し 2 相性の関係を示した。これは図 2-1-1 で示したフルコナゾールの抗真菌活性と同様に以下の効果があることが分かった。

① 効果なし濃度域 (sub-mMIC 以下・最小有効濃度に相当)

② sub-mMIC 効果 (濃度依存的・部分抑制)

③ supra-mMIC 効果、mMIC 効果 (濃度非依存的・静菌的)、

sub-mMIC 効果は、効果なし濃度域から mMIC 効果への移行過程としての濃度依存的効果と考えられた。これらの結果から、3 つの薬物の mMIC や sub-mMIC は *in vivo* 有効濃度に相当し (potency)、さらに有効性 (efficacy : 完全抑制や部分抑制) の観点からも *in vivo* 効果と相関し薬物間で *in vivo* 薬効に関して同等の指標を示すことが分かった。

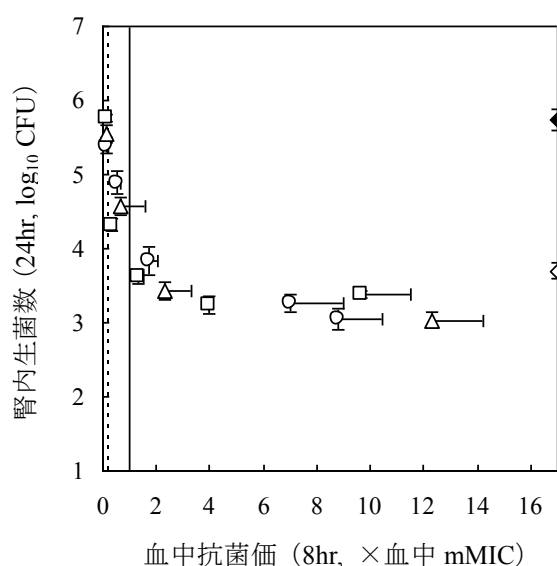


図 2-1-2 フルコナゾール、イトラコナゾールそしてケトコナゾールの血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果

C. albicans を DBA/2 マウスに接種 1 時間後にアゾール系薬を経口投与 (グラフ上の 0 時間) し、薬物投与 8 時間後の血中抗菌価と 24 時間後の腎内生菌数を比較した。◇ : 0 時間における溶剤投与群、◆ : 投与後 24 時間における溶剤投与群、□ : フルコナゾール、○ : イトラコナゾール、△ : ケトコナゾール 実線は血中抗菌価 = 1 (血中 mMIC に相当) を示す。点線は血中抗菌価 = 0.25 (血中 sub-mMIC に相当) を示す。3 薬物の血中抗菌価-時間曲線の相関係数 : $r^2 = 0.93$ 各データは平均 ± 標準偏差を示す (n = 4)。

（４） アムホテリシン B の血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果

C. albicans をマウスに静脈内接種し 1 時間後にアムホテリシン B を投与し、血中抗菌価と腎内生菌数との関係を検証した。アゾール系薬と同様に、血中抗菌価は *in vivo* 効果（potency と efficacy）を反映した（図 2-1-3 a、b）。ただし、濃度非依存性の最大薬効では、アムホテリシン B は殺菌的に作用した。つまり血中濃度が sub-gMIC に達しない場合は、腎内生菌数に対する抑制効果は示さず、血中抗菌価が sub-gMIC 濃度域にある×1 ED₅₀ と×30 ED₅₀ 用量ではその効果は用量依存的であった。×30 ED₅₀ と×90 ED₅₀ 投与 8 時間後に血中抗菌価は 1 以上となり薬物の血清中濃度も gMIC 以上を維持した場合（図 2-1-3a、c）、腎内生菌数に対する殺菌効果は最大となった。

- ① 効果なし濃度域（sub-gMIC 以下）
- ② sub-gMIC 効果（濃度依存的・部分抑制～静菌的作用）
- ③ supra-mMIC 効果、mMIC 効果（濃度非依存的・殺菌的作用）

上記の関係は、8 時間後の血中抗菌価と腎内生菌数を比較することにより、明確となった（図 2-1-3 c）。

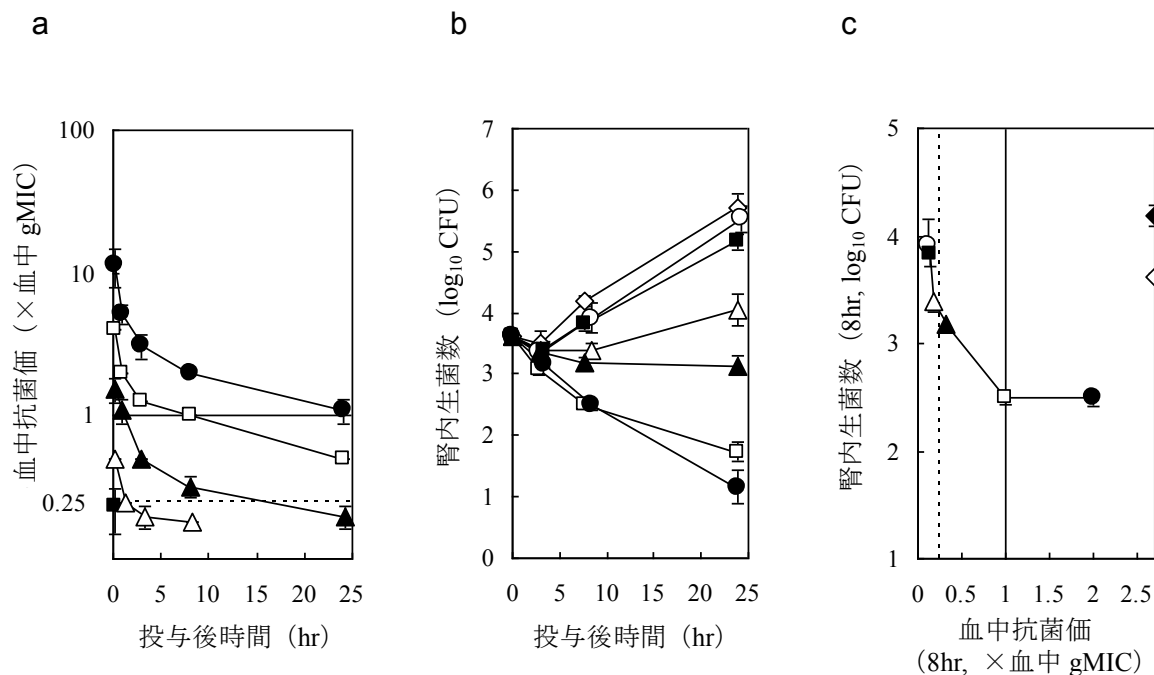


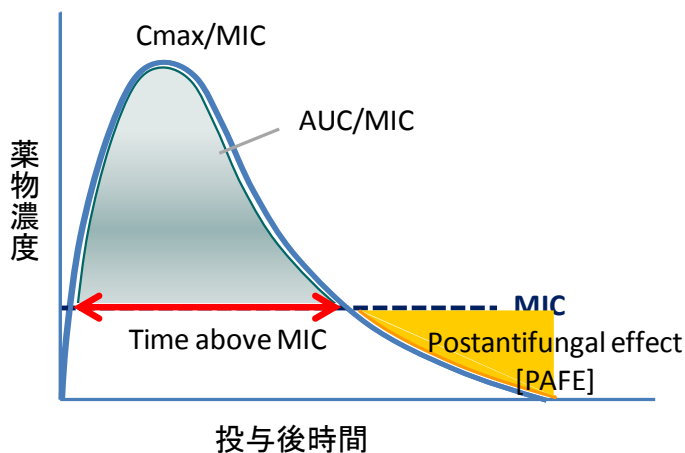
図 2-1-3 アムホテリシン B の血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果

C. albicans を DBA/2 マウスに接種した 1 時間後にアムホテリシン B を尾静脈投与した (グラフ上の時間は投与後経過時間を示す)。薬物の血中抗菌価と腎内静菌数に対する抑制効果が比較された。a: 血中抗菌価、b: 腎内生菌数に対する抑制効果、c: 投与 8 時間後の血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果の関係 a-c: ○; $\times 1/3$ ED₅₀、■; $\times 1$ ED₅₀、△; $\times 3$ ED₅₀、▲; $\times 10$ ED₅₀、□; $\times 30$ ED₅₀、●; $\times 90$ ED₅₀、b: ◇; 溶剤投与群、c: ◇; 溶剤投与群 (薬物投与時点; グラフ上の 0 時間)、◆; 溶剤投与対照群 (投与後 8 時間) 実線は血中抗菌価 = 1 (血中 gMIC に相当) を示す。点線は血中抗菌価 = 0.25 (血中 sub-gMIC に相当) を示す。各データは平均 ± 標準偏差を示す (n = 4)。

2. 最小有効濃度に基づいたアゾール系抗真菌薬の薬動学的解析

抗真菌薬の薬動力学解析では、薬物濃度と、病原体と薬物の接触時間が有効性 (efficacy) に与える影響を明らかにし、薬効増大と相関性の高い PD パラメーター (Cmax/MIC、AUC/MIC、time above MIC) を薬物ごとに決定している。(図 2-2-1, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38)。しかしながら前項の検討から、効果 (殺菌的/静菌的) に拘わらず抗真菌活性には、① 薬物濃度依存的で部分抑制効果を示す sub-MIC 効果と、② 濃度非依存的で最大薬効を示す supra-MIC 効果・MIC 効果が存在することが分かった。これら 2 つの効果は血清添加の MIC と sub-MIC で決定されることから、薬物の PD パラメーターの決定因子は、有効血中濃度 (血中 MIC、sub-MIC) であった。一方、病原体と薬物の接触時間はいずれの効果の発現にも必要であり、effect/efficacy の決定因子ではなかった。したがって、下図に示すように、supra-MIC 効果、MIC 効果、そして sup-MIC 効果は個々に PD パラメーターの素因子 (濃度依存性・非依存性) の影響を受け、有効血中濃度と体内動態に着目した薬効解析が重要であると考えられた。そして最小有効濃度が血中 sub-MIC に相当することから、これまで曖昧になっていた Post antibiotic effect (PAFE 効果)、つまり薬物濃度が最小有効濃度より低下しても抗真菌効果が持続する抗真菌活性の検出が可能となった。

・投与法に基づいたPK/PD解析(現行法)



・有効濃度に基づいたPK/PD解析

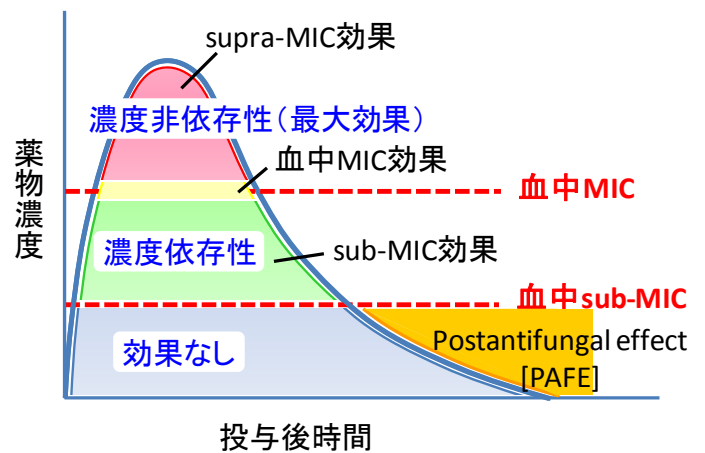


図 2-2-1 薬物動態学/動力学 (PK/PD) 解析

本項では引き続きアゾール系抗真菌薬のフルコナゾール、イトラコナゾール、そしてケトコナゾールを例として、薬効発現に重要な薬動学的パラメーターの検討を行った。

(1) フルコナゾールの AUC 非依存的な薬効の確認

前項で見出した最大薬効を示す飽和濃度（血中 mMIC）が、AUC 依存的な薬効発現に与える影響を検証した。図 2-2-2 は、*C. albicans* 感染マウスモデルにおける静菌的なフルコナゾールの AUC と腎内静菌数に対する効果の関係を示す。

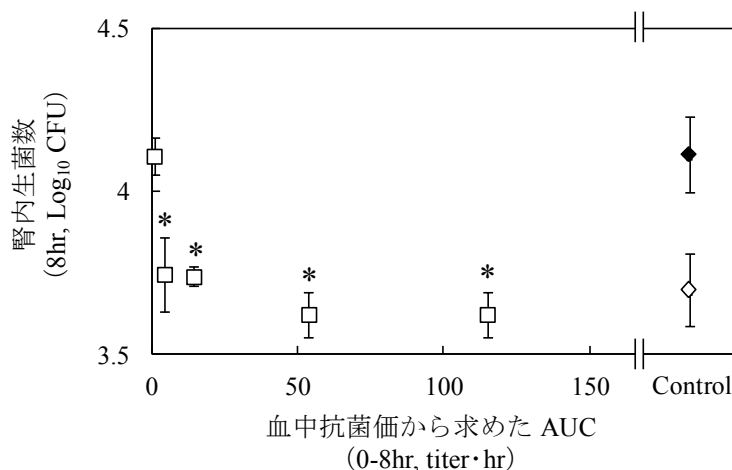


図 2-2-2 フルコナゾールの AUC_{0-8h} と腎内生菌数に対する抑制効果

C. albicans をマウスに接種1時間後にフルコナゾールを経口投与した(グラフ上の0時間)。薬物の用量：×1/3 ED₅₀、×1 ED₅₀、×3 ED₅₀、×10 ED₅₀、×30 ED₅₀ 各用量の投与後8時間までの AUC (AUC_{0-8h}) と腎内静菌数に対する抑制効果が比較された。AUC_{0-8h} は血中 sub-mMIC 以上の AUC として計算され、薬物の活性体の AUC を示す。◇：溶剤投与群(投与後0時間)、◆：溶剤投与群(投与後8時間) 各データは平均±標準偏差を示す (n = 4)。0時間と各投与群(投与8時間後)の腎内生菌数の比較のために統計解析された。*は P 値<0.05 を示す。

AUC の算出のために薬物濃度に代えて血中抗菌価を用いて、投与後8時間の血中抗菌価-時間曲線から sub-mMIC 以上の活性体としての AUC_{0-8h} を求めた。AUC-腎内静菌数曲線は2相性を示し AUC 依存性と非依存性の抗真菌活性があることが分かった。特にフルコナゾールの AUC_{0-8h} が 50 titer·h 以上の時、腎内生菌数に対する抑制効果は飽和し最大薬効（静菌作用）に到達した。これまでアゾール系薬の PK/PD 解析では、その薬効は AUC/MIC に依存することが報告されている (32, 34, 35, 36, 37)。今回の結果は、アゾール系薬の薬効は AUC 依存性効果に加えて、AUC に依存しない用

量域が存在することが示された。

(2) 有効血中濃度を基本とした PK/PD 解析の用量設定

第二章で示されたように、アゾール系薬物の投与 8 時間後の血中抗菌価と 24 時間後の腎内静菌数の 2 相性曲線（図 2-1-2）の変曲点付近に ED₉₀ 用量の活性が位置することを見出した（図 2-2-3）。ここでは、ED₉₀ 用量を腎内静菌数を 24 時間にわたって増殖抑制する最小用量と定義した。そして、この最小用量について血中抗菌価を用いてアゾール系 3 薬物の薬動学的解析を行った。

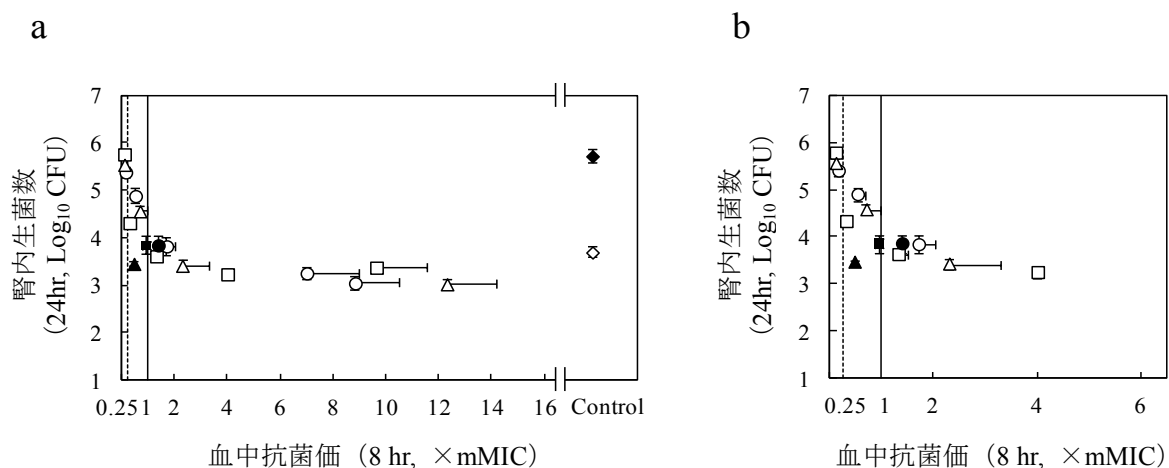


図 2-2-3 フルコナゾール、イトラコナゾールそしてケトコナゾールの血中抗菌価と腎内生菌数に対する抑制効果

C. albicans を DBA/2 マウスに接種し 1 時間後にアゾール系薬を経口投与した（グラフ上の 0 時間）。a：薬物投与 8 時間後の血中抗菌価と 24 時間後の腎内生菌数を比較した。◇：0 時間における溶剤投与群、◆：投与後 24 時間における溶剤投与群、□■：フルコナゾール、○●：イトラコナゾール、△▲：ケトコナゾール、■●▲：各薬物の ED₉₀ 投与量 実線は血中抗菌価 = 1（血中 mMIC に相当）を示す。点線は血中抗菌価 = 0.25（血中 sub-mMIC に相当）を示す。イトラコナゾールの血中抗菌価は、活性代謝物の抗真菌活性を含む。3 薬物の血中抗菌価－時間曲線の相関係数： $r^2 = 0.88$ 各データは平均±標準偏差を示す（n = 4）。b: a の図の拡大図

(3) 有効血中濃度に基づいた最少量投与時の血中抗菌価 (PK/PD 解析)

マウスに *C. albicans* を尾静脈接種して 1 時間後に ED₉₀ 用量のアゾール系 3 薬物を経口投与し、2 時間おきに血中抗菌価を測定した (図 2-2-4)。その結果、3 薬物の投与後の最高血中抗菌価は、13.5 倍もの差があったにも拘わらず、supra-mMIC と mMIC 効果の持続時間は 5.7–9 時間であり、その後の sub-mMIC 効果の持続は投与後 12.8–14 時間と収束した (表 2-2-1)。これらの知見から、ED₉₀ 用量の 3 薬物の PD パラメーターとして time above sub-mMIC が重要であることが示された。

ところで、静菌的なアゾール系薬の血中 mMIC 以上の濃度域は、濃度非依存性でその薬効は増大しなかった。したがって、mMIC 以上の濃度域は薬効増大域として考慮されるべきではなく、supra-mMIC 効果は m-MIC 効果として見なすことができる。ED₉₀ 投与時の 3 薬物各々の総 AUC_{0-24h} は 4.9 倍もの差異があったが、mMIC 以下の AUC_{0-24h} は、表 2-2-1 に示すようにその差は縮小した。

また本検討ではアゾール系薬の *in vivo* 効果に対する PAFE を検出した。薬物濃度が低下し sub-mMIC 効果が消失する 12.8–14 時間以降 24 時間まで腎内静菌数は増加しないことから、この時間が PAFE であることが分かった。

結論としてアゾール系薬の ED₉₀ 用量の共通の PD パラメーターとして、mMIC 効果後の sub-mMIC 効果の持続時間 (12.8–14 時間) と mMIC 以下の AUC_{0-24h} (5.6–8.1 titer·hr) と考えられた。

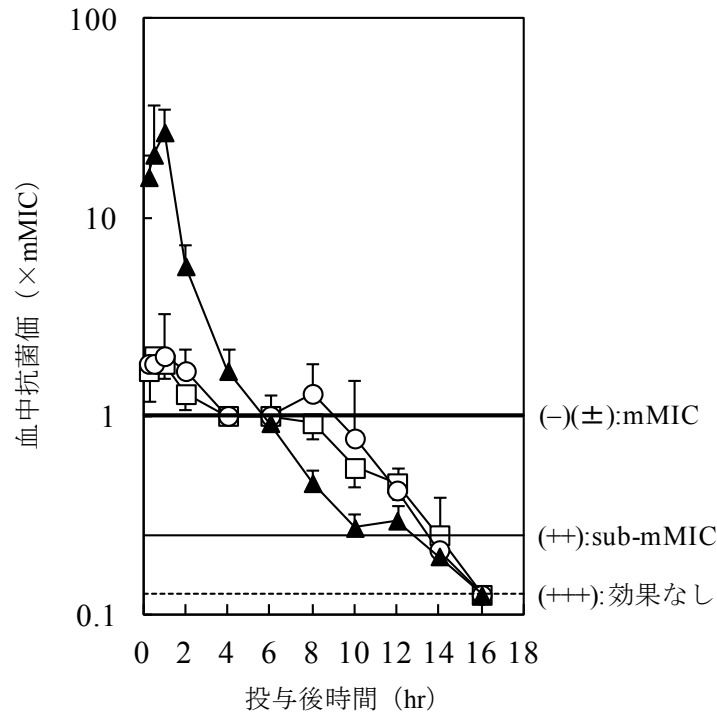


図 2-2-4 フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾールの ED₉₀ 投与をマウスに投与した時の血中抗菌価

C. albicans を DBA/2 マウスに接種 1 時間後にアゾール系薬を経口投与し(グラフ上の 0 時間)。経時的に血中抗菌価を測定した。太線は血中抗菌価 = 1 (血中 mMIC に相当) を示す。実線は血中抗菌価 = 0.25 (血中 sub-mMIC に相当) を示す。点線は菌の増殖に影響を与えなかったことを示す (血中抗菌価 = 0.125)。イトラコナゾールの血中抗菌価は、活性代謝物の抗真菌活性を含む。□: フルコナゾール、○: イトラコナゾール、▲: ケトコナゾール。各データは平均±標準偏差を示す (n = 4)。

表 2-2-1 *C. albicans* ATCC90028 感染マウスモデルにおけるアゾール系薬 ED₉₀ 投与量の PD パラメーター

	最高 血中抗菌価 ^a	mMIC 効果 持続時間(hr) ^b	sub-mMIC 効果 持続時間(hr) ^c	PAFE 持続時間 (hr) ^d	総 AUC _{0-24h} (血中抗菌価・hr) ^e	mMIC 以下 AUC _{0-24h} (血中抗菌価・hr) ^f
フルコナゾール	2.0 (1) ^g	6.0 (25.0) ^h	8.0	10	9.1 (1) ^g	7.5 (1) ^g
イトラコナゾール ⁱ	2.0 (1.0)	9.0 (37.5)	4.5	10.5	10.4 (1.1)	8.1 (1.1)
ケトコナゾール	26.9 (13.5)	5.7 (23.8)	7.1	11.2	44.5 (4.9)	5.6 (0.75)
平均持続時間 (hr)						
[24 時間当たり占有 率(%)] ^j	ND	6.9 (28.8) ^j	6.5 (27.2)	10.6 (44.0)	ND	ND

C.albicans 感染 1 時間後に ED₉₀ 用量をマウスに投与した時の血中抗菌価を薬物濃度に代えて算出された。

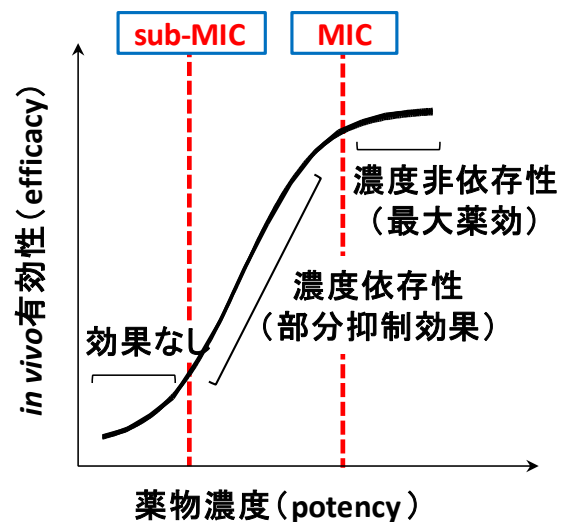
- a) 単回投与後のピーク血中抗菌価（血中抗菌価、もしくは×mMIC）
- b) supra-mMIC 効果を含む：単回投与後の血中抗菌価が 1（あるいは血中濃度が mMIC）を越える時間
- c) mMIC 効果後に出現する：血中抗菌価が 1 と検出限界の間の濃度域の（あるいは血中濃度が sub-mMIC 域に存在する）持続時間
- d) 血中抗菌価が検出限界以下に低下（あるいは血中濃度が sub-mMIC 値以下に低下）した時から 24 時間後までの持続時間
- e) 薬物が抗真菌活性を有する時の総 AUC_{0-24h}：総 AUC_{0-24h} から sub-mMIC 以下の AUC を除いた、あるいは supra-mMIC 効果、mMIC 効果と sub-mMIC 効果を有する時の AUC
- f) 血中抗菌価－時間曲線において血中 mMIC と sub-mMIC の間の AUC_{0-24h}
- g) 対フルコナゾール値比（倍）
- h) 薬物の mMIC 効果の持続時間が 24 時間に占める割合（%）
- i) 活性代謝物の活性を含む
- j) 3 つのアゾール系薬の平均値

考察

血中抗菌価を用いて、抗真菌薬の血中 MIC と播種性 *C. albicans* 感染マウスモデルにおける腎内生菌数に対する抗真菌効果の関係が明らかにされた。*C. albicans* に対する血中 MIC や sub-MIC は、抗真菌薬の *in vivo* 抗真菌効果の有効濃度 (potency) に相当し、それぞれの濃度域における効果の大きさ (efficacy) も関連した (図 2-2-5)。つまり薬物の血中 MIC や sub-MIC は、potency と efficacy の両方についてマウス感染モデルにおける腎内生菌数に対する抑制効果を反映した。

図 2-2-5

血中 MIC と *in vivo* 効果との関係



これは薬物の作用機序や蛋白結合などの特性からもたらされる薬物ごとに異なる *in vitro* と *in vivo* 効果の乖離を血清添加のアッセイ系で補正できることを示している。マウスにおいて活性代謝物を産生するイトラコナゾールの血中抗菌価も他のアゾール系薬と同等性を示したことからその有用性が強調された。アゾール系薬は *C. albicans* に対して静菌的に作用しアムホテリシン B は殺菌的に作用するが、血中 mMIC と gMIC ならびに腎内生菌数に対する抑制効果の関係は同じで、次に示す 3 種の効果に分類された。

- ① 効果なし濃度域 (血中 sub-MIC 以下)
- ② sub-MIC 効果 (濃度依存的・部分抑制)

効果なし濃度域から MIC 効果や supra-MIC 効果への移行過程と考えられる。

③ supra-MIC 効果、MIC 効果（血中 MIC 以上：濃度非依存的・最大薬効）

最大薬効ではアゾール系薬は静菌的作用を、アムホテリシン B は殺菌的作用を示した。

抗真菌薬の PK/PD 解析の観点から整理すると、sub-MIC 効果、mMIC 効果、そして supra-mMIC 効果は、有効血中濃度（血中 MIC、sub-MIC）によって決定され、血中 MIC と sub-MIC は重要な PD パラメーターの決定因子でもあった。また、作用時間（薬物の病原体への暴露時間）はいずれの効果にも必要であることから、PD パラメーターの決定因子ではないと考えた。今回検討した薬物では、効果（静菌的/殺菌的）に関係なく血中 MIC (mMIC または gMIC) が最大薬効を示す飽和濃度であった。この飽和の要因としてまず想定されるのは、薬物分子によって菌体内の薬物の標的分子が飽和されることが挙げられ、その他にはマウス体内における感染部位への薬物の移行や血液中の薬物の溶解性の飽和 (31) などが考えられた。今回の感染モデルでは *in vivo* における飽和濃度は、mMIC や gMIC と一致したが、他の感染モデル（感染部位、菌種・菌株、接種菌量、薬物投与法など）でも確認する必要がある。

上記の薬効に関する考えから有効血中濃度に基づいた薬動学的解析法を確立した。アゾール系薬の最大薬効に必要な 1 日当たりの最小用量 (ED₉₀) の薬動学的解析を以下の観点から実施した。

① 最大薬効を得るための用法と用量の検討

最大薬効を示す飽和濃度を維持することが、薬物の治療効果に重要である。

② 薬動学的観点からの *in vivo* 薬効機序解析

ED₉₀ 活性の発現に必要なアゾール系薬の共通の効果を同定する。

薬物は生体内の経時的な濃度変化に応じて種々の効果 (effect) を集積させた結果として総合的に薬効 (efficacy) を発現する。そのため、最小用量など一定の *in vivo* 効果を発現する時の薬効機序解析を行うことは重要である。

3つのアゾール系薬物（フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール）のED₉₀量を投与した時、最大血中抗菌価は13.5倍もの差があったが、いずれの薬物も効果（effect）の飽和点であるmMIC効果（supra-mMIC効果を含む）を5.7–9時間持続しマウス腎内生菌数に対する最大効果（静菌的効果）を発現した。たとえばフルコナゾールでは、ED₉₀効果を発揮するためには、24時間当たりのtime above mMICは25%であった（表2-2-1）。

このmMIC効果の菌糸発育抑制作用を維持するためにsub-mMIC効果が後に続き、薬物の投与後12.8–14時間まで持続した。この3薬物間でsub-mMIC効果の持続が収束されたことから、sub-mMIC効果の持続時間が24時間の静菌作用を発揮するために重要であると考えられた。このことから、アゾール系薬が最大薬効を発揮するためには、効果の飽和濃度に相当する血中mMICに到達することが必要であり、sub-mMIC効果の持続も不可欠であると考えられた。さらに抗真菌効果の飽和濃度、つまり血中mMICを上回るsupra-mMIC効果がmMIC効果と同等であることを考慮してED₉₀効果（efficacy）の薬効機序は、以下の2つの考えが成立した。

- ① mMIC効果に続くtime above 血中sub-mMIC
- ② mMIC効果を含む血中mMIC以下のAUC

そして血中抗菌価による知見では、アゾール系薬が*in vivo*においても静菌的作用を有し抗真菌効果の飽和濃度で最大薬効を示した。ところが、これまでに報告されたアゾール系薬のPDパラメーターがAUC依存性であることとは矛盾するように思われる（図2-2-2, 32, 34, 35, 36, 37）。従来の抗真菌剤の分割投与法によるPDパラメーターを決定する手法では、我々が指摘する飽和濃度を見逃していると思われる。

また、本感染モデルにおいてsub-mMIC効果に続いて出現するPAFE効果も抗真菌効果に寄与していることが判明した。3化合物の比較により、単にmMIC効果が24時間継続するのではなく、mMIC効果、sub-mMIC効果そしてPAFEが共通の持続時間として機能していることが明らかとなった。これまで*in vitro*におけるPAFEの検

証は多くの報告例が存在するが、実験条件が多岐にわたるため一環した知見は得られていない(39, 40, 41, 42)。本モデルではこの3種(mMIC 効果、sub-mMIC 効果、PAFE)の抗真菌効果の内、PAFEの持続時間が最大で1日当たり占有率が44%であったことは意外であり、今後他の感染モデル系でも確認が必要である。

一方、これまでの抗真菌薬のPK/PD解析では、一定の総投与量を分割投与した時に、薬効の増大と相関するPDパラメーターが決定されている(32, 33, 34, 35, 36, 37, 38)。パラメーターとしては、AUC/MIC、Cmax/MIC、そしてtime above MICのいずれかから求めるものである。ところが、血中抗菌価から得た薬効解析結果から、PDパラメーターは特定のパラメーターに決定されるものではなく、濃度依存性と非依存性の効果が存在することが明らかとなった。最大薬効の発現のためには血中濃度が血中MICを上回る必要があった。すなわちキーパラメーターは、time above 血中MICであった。さらにMIC測定の世界標準法であるCLSIやEUCAST推奨法には課題がある。

- ① 薬効の指標となるMICが*in vivo*効果を反映するかが検証されていない。
- ② sub-MICの指標がなくPAFE効果を識別できない。

このため、実際のtime above MICやtime above sub-MICが求められない、さらにMIC効果とsub-MIC効果、ならびにPAFE効果を識別できない。

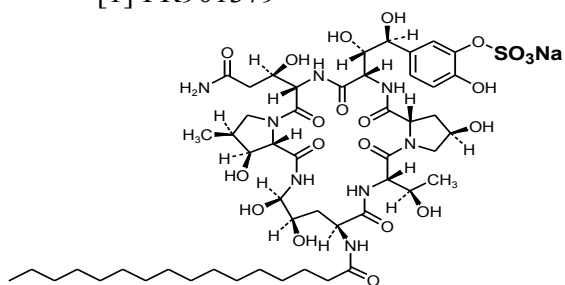
したがって上記の標準法は臨床分離株の感受性試験に留めることが望ましく、有効血中濃度や有効性を反映する血中MICと血中抗菌価は、標準法の課題を解決し薬動学的解析においても臨床治療の最適化のためにも有用な手段となると考えられる。

(第三章) 血清添加培地の最小発育阻止濃度 (gMIC) による echinocandin 系化合物の *in vivo* 効果予測

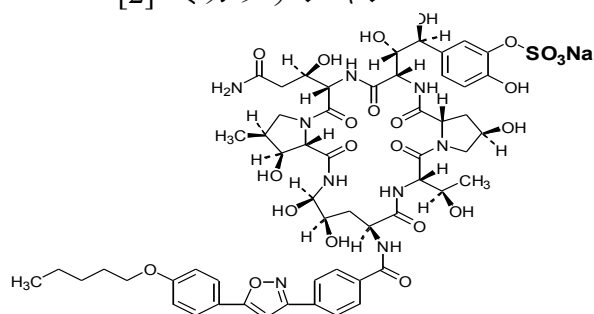
前章までにおいて、マウス血清添加の MIC 測定法は、既存の抗真菌薬の *in vivo* 効果を反映することが示された。次に今回確立したマウス血清添加の MIC 測定法を、エキノカンディン系の醗酵天然物 FR901379 (WF11899A, 11, 12) [1] の環状ペプチド構造に付加した脂肪酸側鎖を変換することによる抗真菌活性の向上に応用した。本誘導体の初期スクリーニングにおいて、*in vitro* と *in vivo* 活性が相関しないことは、体系的なスクリーニングが破たんし、化合物間の構造活性相関の確立や有望化合物の選択に支障をきたした。そのため *in vivo* 効果を反映する *in vitro* 評価法の確立は、抗真菌薬の開発において極めて重要な要素となった。

FR901379 は、真菌症の主要原因菌種であるカンジダに対しては殺菌的な抗菌力を有しており、判定基準の明確な *C. albicans* に対する MIC の *in vivo* 効果予測を検証することは都合が良かった。さらに化合物の '2 倍段階希釈系列を用いて決定する MIC 値' と、'感染モデルにおける *in vivo* 効果' のそれぞれの実験誤差から許容される予測精度と、スクリーニングにおける化合物の選択基準 (criteria) の設定のために、感染モデルにおける *in vivo* 効果を 3 倍の範囲内で予想できる MIC 測定系の構築を目標とした。ここではミカファンギン[2] を対照薬物として、カスポファンギン (メルク社) や最適化過程において合成された誘導体の血中 MIC による *in vivo* 効果の予測精度を検証した。

[1] FR901379



[2] ミカファンギン



実験方法

(1) 菌株

本章においては、エキノカンディン誘導体の最適化評価に使用した *C. albicans* FP633 株を用いた。*C. albicans* FP633 株は、サブローデキストロース斜面寒天培地（2% グルコース、1% ポリペプトン、1.5% 寒天、SDA）で 30℃で 2 日間培養し、その後室温で維持された。種菌は 1 ヶ月に 1 度凍結ストックから更新され斜面寒天培地を作成した。

(2) 試薬

ミカファンギンと最適化過程で検討されたエキノカンディン誘導体は、アステラス製薬（旧藤沢薬品）で合成された。カスポファンギン（カンシダス）は、メルク社から購入された。

(3) RPMI MIC 測定

前章までと同様に、CLSI M27-A2 法（17）に準じて、RPMI 1640 培地中の抗菌力を測定した。水酸化ナトリウム（NaOH）で pH 7.0 に調整した 165 mM 3-*N*-morpholino-*o*-propanesulfonic acid（シグマ アルドリッチ ジャパン 株式会社、東京、MOPS）を添加した RPMI 1640 培地（RPMI 培地）を使用した。適当に溶解させた薬物を RPMI 培地で希釈し、128 µg/ml に調整した。この 100 µL の薬液（128 µg/ml）を 96 穴マイクロプレート（住友ベークライト、東京）において、RPMI 培地を使用して 2 倍段階希釈した。このようにして作成した希釈系列に RPMI 培地で調整した 100 µL の菌液を添加した（菌終濃度：約 10^3 cfu/mL）。このマイクロプレートを 35℃、24 時間培養し、80 %の増殖抑制を示す最小濃度を MIC（RPMI gMIC）とした。

(4) 血中 gMIC

エキノカンディン誘導体のスクリーニングに用いる Slc-ICR マウスから血清を採取し以降の操作は前章までの血中 MIC 測定の手順に従った。Slc-ICR マウス（6 週令、日本エスエルシー、静岡）から採取した血清を非働化（56.5℃、30 分）し、0.22 μm 径 ミリポアフィルター（日本ミリポア、東京）で濾過し、-80℃で保存した。アッセイ時にマウス血清を非働化マウス血清に 1/100 量の NaOH で pH 7.4 に調整された 2M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid（同仁化学研究所、熊本、HEPES-NaOH）と 1/100 量の *C. albicans* 1×10^6 cfu/mL を添加し血清培地とした。血清培地で適当に希釈した薬物溶液（64 $\mu\text{g/mL}$ ）をマイクロプレート上で血清培地で希釈し、2 倍段階希釈系列を作成した。このプレートを 37℃、5% CO₂ 下で 14 時間培養した。*C. albicans* の菌糸伸長に対する抑制効果を倒立顕微鏡（IX70、オリンパス株式会社、東京）を用いて以下の基準で観察した。+++：溶剤添加群と同程度の増殖、++：約 60 %以下の増殖抑制、+：約 30 %以下の増殖抑制、±：菌糸伸長抑制、-：出芽抑制もしくは菌の消失。アゾール系薬の場合、mMIC は、薬物が±～-の抑制効果を示す最小濃度とした。また、++の抑制効果を示す最小濃度を sub-mMIC とした。エキノカンディン誘導体は、*C. albicans* に対して殺菌的に作用するので、-の抗菌力を示す最小濃度を gMIC とし、++の抑制効果を示す最小濃度を sub-gMIC とした。

（5）薬物調整

ミカファンギン、カスポファンギン（カンシダスとしてメルク社から購入）、そしてエキノカンディン誘導体は、*in vitro* アッセイ時には、滅菌したイオン交換水を用い、*in vivo* 薬効試験では、生理食塩水に溶解した。

（6）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による薬物濃度測定

化合物の血清中濃度は、HPLC 法により測定された。5 mg/mL の薬物を尾静脈内投与した Slc:ICR マウス（5 週令、オス）から、投与後 30 分（C_{0.5hr}）を含む経時的な血清の採取を行った。この血清サンプルは、2 倍量のメタノール（ナカライテスク、京

都)で抽出した。濃度標準用の血清サンプルも同様に2倍量のメタノールで抽出された。10–20 μL の抽出液を TSK gel ODS-80TM カラム(東ソー、東京)を装着した HPLC (日本ウォーターズ、東京)に供した。化合物の同定には、1 M NaOH で pH 7.0 に調整した 0.5% KH_2PO_4 (関東化学、東京)とアセトニトリル(和光純薬工業、大阪)の混合液を移動層とし、210 mM における紫外線吸収で検出した。この混合比は、各化合物の保持時間が10分程度となるように、事前に調整された。種々の濃度のマウス血清で調整した薬物の標準品の検出ピーク面積から検量線(標準直線)を作成し、各サンプルの面積から回帰することによって、血清サンプル中の薬物濃度を測定した。

(7) 体内動態(PK)解析

HPLC法ならびに血中抗菌価法で測定したイトラコナゾールを投与したマウスの血中濃度は、1-コンパートメント・モデルを使用して PK パラメーターを算出した(23)。

(8) *C. albicans* 感染マウスにおける *in vivo* 効果(延命効果)

ヒトにおける日和見感染を再現するために、Slc:ICR マウス(4週令、オス、8匹/群)にサイクロフォスファミドを感染4日前に腹腔内投与し好中球を減少させる。*C. albicans* FP633(約 3×10^6 cfu/マウス)を接種し、1時間後に化合物を尾静脈投与した。化合物の代わりに生理食塩水を投与した対照群は、7日以内に死亡した。感染14日のマウスの生死判定から、プロビット法を用いて化合物の50%延命効果(exp. ED₅₀)を求めた。感染実験のロット間の誤差を解消するために、各実験ロットにおいて設定された対照のミカファンギンの作用に対する化合物の *in vivo* 効果比が決定された。本系におけるミカファンギンの実験ロット間の平均的な延命効果は、ED₅₀=0.33 mg/kgであった。

(9) *in vitro* MIC からの *in vivo* 効果予測

血中 gMIC の *in vivo* 効果予測性を検証するために、化合物の ED₅₀ 値が gMIC と体

内動態パラメーターから推定された。つまりミカファンギンの gMIC や体内動態パラメーターを基準とした場合、より強力な MIC とより大きな体内動態パラメーター値 (AUC や $C_{0.5hr}$) を示す化合物が *in vivo* 効果が強いと想定される。従って以下の計算式によって、化合物の gMIC と薬物動態パラメーターから ED₅₀ 値を推定した (Est. ED₅₀)。

AUC 値を考慮する場合：

Est. ED₅₀[AUC]比

$$= (\text{被験化合物の gMIC} / \text{ミカファンギンの gMIC}) \times (\text{ミカファンギンの AUC} / \text{被験化合物の AUC})$$

Est. ED₅₀[C_{0.5hr}]比

$$= (\text{被験化合物の gMIC} / \text{ミカファンギンの gMIC}) \times (\text{ミカファンギンの } C_{0.5hr} / \text{被験化合物の } C_{0.5hr})$$

gMIC は血清添加培地もしくは CLSI 法による測定値を示し、たとえば血清添加培地の測定値を用いた場合、est. ED₅₀[血清・AUC]、そして est. ED₅₀[RPMI・AUC]などと表記した。

(10) *C. albicans* 感染マウスにおけるミカファンギンの腎内生菌数測定

血中 gMIC の *in vivo* 効果の予測性の要因を検証するために、ミカファンギンの *C. albicans* 感染マウスの腎内生菌数に対する抑制効果と血中濃度の関係を検討した。上記の感染モデルにおいて、*C. albicans* FP633 を接種 1 時間後 (グラフ上の 0 time) にミカファンギンを尾静脈内投与した (4 匹/群)。その後、経時的にマウスから腎を採取し、5 mL の生理食塩水中で組織をホモジェネートし、生理食塩水で希釈後、SDA 培地上に塗抹して 30℃で培養し、発育した *C. albicans* のコロニーを計測して腎内生菌数を求めた。

結果

(1) 被検薬物・化合物の抗真菌活性と体内動態

エキノカンディン誘導体は、*C. albicans* に対して殺菌的に作用するため、血中 MIC 測定法では、アムホテリシン B と同様に、菌の発育抑制を指標とする gMIC と sub-gMIC を判定基準とした。対象化合物としてエキノカンディン系誘導体であるミカファンギンとカスポファンギンを含む 15 化合物について、*C. albicans* に対する *in vitro* 活性による *in vivo* 効果の予測性を検討した。化合物の *in vivo* 効果の指標として、*C. albicans* をマウスに静脈内接種後、化合物を投与して 50% の延命効果を exp. ED₅₀ として *in vivo* 効果の指標とした。*in vivo* 活性は、実験ロット間の測定値の誤差を補正するため、実験ロットごとに標準薬として設定したミカファンギンの ED₅₀ 値を基準として活性比として示した。また血中 MIC の成績は、標準法である CLSI M27-A2 法 (17) の MIC 値と比較した。CLSI 推奨法では、肉眼判定により化合物の菌の増殖抑制効果を gMIC として評価する。これら 2 種の MIC 測定法をもとにした化合物の延命効果の予測において、exp. ED₅₀ 測定値の精度とスクリーニングにおける選択基準の厳密性を考慮して 3 倍以内の誤差を許容範囲とした。表 3-1 に 15 検体の *in vitro* および *in vivo* 活性、ならびに体内動態プロファイルを示す。体内動態プロファイルは、マウスに 5 mg/kg の用量を静脈内投与した際の動態パラメーターを示す。

表 3-1 Echinocandin 化合物の *in vitro* ならびに *in vivo* 抗真菌活性と体内動態パラメーター

	MIC		マウス 感染モデル 延命効果	体内動態パラメーター ^d		
	血清 ^a	RPMI ^b		C _{0.5hr}	t _{1/2}	AUC _{0-∞}
ミカファンギン	1	0.0313	1.0	10.1	5.1	78.4
カスポファンギン	0.5	0.5	0.24	29.4	5.8	218.9
# 1	32	0.5	7.8	30.3	2.0	109.0
# 2	32	1	8.5	24.1	2.4	100.2
# 3	1	0.0156	2.0	4.9	9.1	47.7
# 4	2	0.0625	0.71	18.8	3.5	105.0
# 5	0.5	0.0313	0.63	7.6	7.7	89.2
# 6	2	0.0313	0.78	9.9	5.6	86.8
# 7	0.25	0.0078	0.85	3.6	9.5	46.3
# 8	4	0.0625	1.78	21.1	3.7	115.9
# 9	1	0.125	0.28	12.5	2.4	49.0
# 10	0.125	0.0078	0.41	2.6	3.7	13.8
# 11	0.5	0.0078	0.72	5.0	10.5	69.8
# 12	0.25	0.0039	0.50	4.6	8.8	56.7
# 13	0.125	0.0313	0.11	7.4	8.8	92.4

a) 血中 MIC は、マウス血清培地中で求めた (μg/mL)。

b) CLSI M27-A2 法 (17, 一部改変) に従って求めた (μg/mL)。

c) Exp. ED₅₀ は実験的に求められ、ミカファンギンの exp.ED₅₀ 値に対する化合物の ED₅₀ 比を示す。実験ロット間の ED₅₀ の変動をミカファンギン (ED₅₀ = 0.33 mg/kg) に対する活性比として補正した。

d) 5mg/kg の化合物を尾静脈投与した時の体内動態パラメーターを示す。C_{0.5hr}: μg/mL、t_{1/2}: hr、AUC_{0-∞}: hr・μg/mL

(2) 血中 gMIC からの *in vivo* 効果 (exp. ED₅₀) の予測性

まず、15 検体のエキノカンディン誘導体の gMIC 値と *in vivo* 感染モデルにおいて実験的に求めた exp. ED₅₀ 値を直接比較した (図 3-1)。その結果、血清添加培地と CLSI 法による gMIC と exp. ED₅₀ の相関性は、それぞれ $r^2 = 0.97$ と $r^2 = 0.66$ で血清添加培地の方が予測性が高かった。血清添加培地では、15 検体の内 10 検体が 3 倍以内の精度で予測可能で、5 検体が 3 倍以上の乖離を示した。

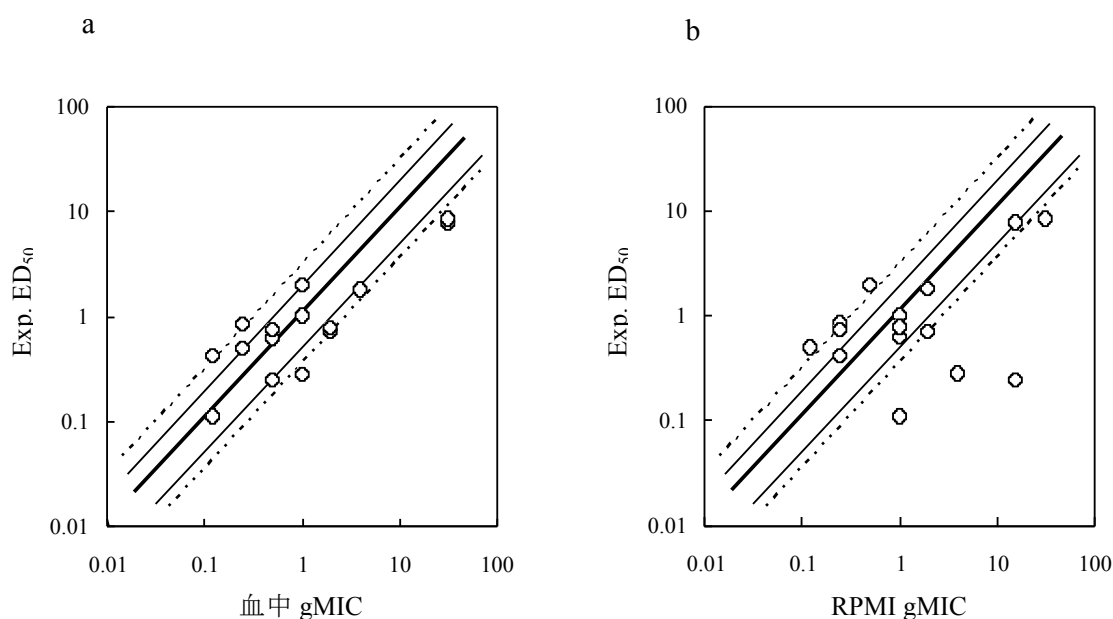


図 3-1 Echinocandin 化合物の *C. albicans* 感染マウスモデルにおける延命効果と MIC との関係

a : マウス血中 gMIC、b : RPMI gMIC (CLSI 27-A2 法一部改変) Exp. ED₅₀ 値は実験的に求められた。Exp. ED₅₀ と gMIC はいずれもミカファンギンの活性に対する化合物の活性比を示す (表 3-1 の抗真菌活性に基づく)。特に exp. ED₅₀ は各実験ロット内に設定されたミカファンギンの活性値を基準として化合物の exp. ED₅₀ 値が補正された。太線は exp. ED₅₀ 値と gMIC 値の一致を示し、実線と点線は exp. ED₅₀ 値と gMIC 値の 2 倍および 3 倍の乖離を示す。

(3) 血中 gMIC を体内動態パラメーターで補正した *in vivo* 効果予測

化合物の *in vivo* 効果に影響する因子として、抗菌力 (gMIC) 以外に体内動態が考えられる。血中 gMIC がより精度良く *in vivo* 効果を反映することを確認するために、化合物の体内動態を考慮した。つまり gMIC と薬物のマウス体内動態パラメーターが

ら延命効果を estimated ED₅₀ (est. ED₅₀) として推定し、exp. ED₅₀ と比較した。薬物動態パラメーターは、HPLC 法で求めた化合物の血中濃度 (AUC や投与 30 分後の血中濃度[C_{0.5hr}]) から算出した。実験方法に示すようにミカファンギンの gMIC やパラメーターと比べた場合、より強力な MIC とより大きな体内動態パラメーター (AUC や C_{0.5hr}) を有している化合物が、*in vivo* 効果が強いと想定し、est. ED₅₀ を予測した。

各化合物の血中 gMIC 値を体内動態パラメーターとして AUC 値で補正した場合 (図 3-2a)、exp. ED₅₀ 値と est. ED₅₀ は良好に相関した ($r^2 = 0.98$) が、化合物#9 の est. ED₅₀[血清・AUC] は、exp. ED₅₀ よりも 5 倍以上低かった。さらに C_{0.5hr} 値で補正した est. ED₅₀[血清・C_{0.5hr}] の場合も、exp. ED₅₀ 値と est. ED₅₀ は良好に相関し ($r^2 = 0.98$)、その内 13 検体の exp. ED₅₀ 値は、C_{0.5hr} と gMIC から推定した est. ED₅₀ と 2 倍以内の誤差で近似し、残り 2 検体は乖離が 3 倍以内の誤差であった (図 3-2b)。一方、CLSI 法による gMIC 値は exp. ED₅₀ との相関性も低く、これらの体内動態パラメーターで補正しても 10 倍以上の乖離を示す化合物も複数個存在した (図 3-2c、d)。これらの結果から、本研究で確立した血中 gMIC 測定は標準法と比べて *in vivo* 効果を良好に予測できることが示された。

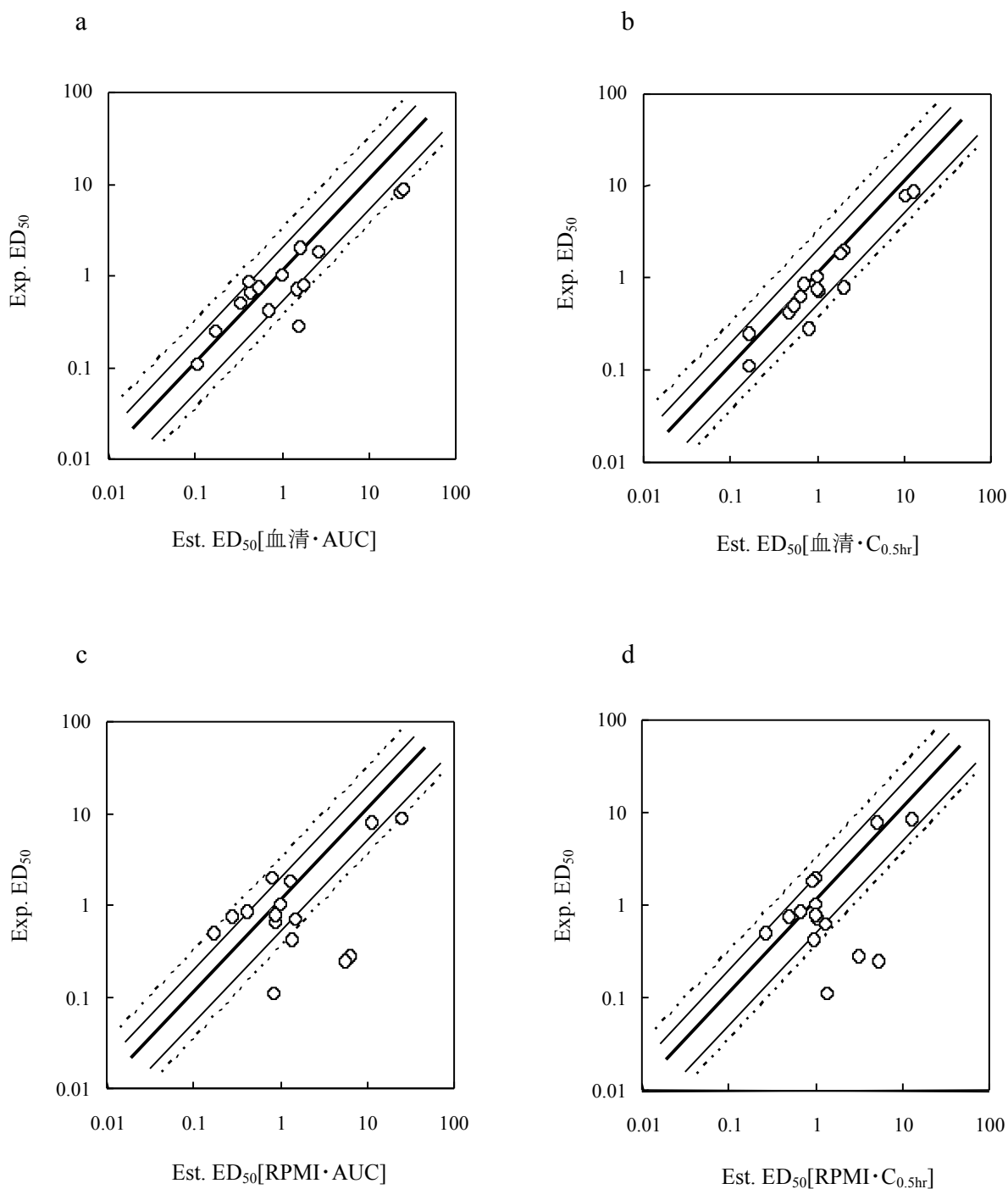


図 3-2 Echinocandin 化合物の MIC による体内動態パラメーターで補正した場合の ED_{50} の予測値

体内動態パラメーターとして AUC と $C_{0.5hr}$ が用いられた。Est. ED_{50} 値は、(a、b) マウス血中 MIC、あるいは (c、d) RPMI gMIC 値に基づいて、実験方法に示すように体内動態パラメーターで補正された。Exp. ED_{50} と est. ED_{50} はいずれもミカファンギンの活性に対する化合物の活性比を示す。太線は ED_{50} 値と MIC 値の一致を示し、実線と点線は、各々 ED_{50} 値と MIC 値の 2 倍と 3 倍の乖離を示す。

（４）ミカファンギンの血中 gMIC と腎内生菌数に対する抑制効果との関係

次に、エキノカンディン誘導体の血中 gMIC 値が、良好に *in vivo* 効果を予測できる要因をミカファンギンを例として検討した。*C. albicans* 感染マウスモデルにおける腎内静菌数に対するミカファンギンの抑制効果と血清添加の gMIC との関係を比較した（図 3-3）。感染マウスモデルにおける経時的な薬物濃度と腎内静菌数に対する抑制効果に関連性が認められた。すなわち、ミカファンギンの血中濃度が血中 sub-gMIC を上回らない時は、腎内静菌数に対する抑制効果も見られなかった。そして血中 sub-gMIC 領域にある時は部分抑制効果を示し、ミカファンギンの血中濃度が血中 gMIC を上回る時は、腎内生菌数に対して殺菌的に作用した。この結果から、腎内生菌数に対する抑制効果を指標とした場合、ミカファンギンの血中 gMIC はその有効血中濃度に相当し effect/efficacy（部分抑制や殺菌作用）も反映することが示された。

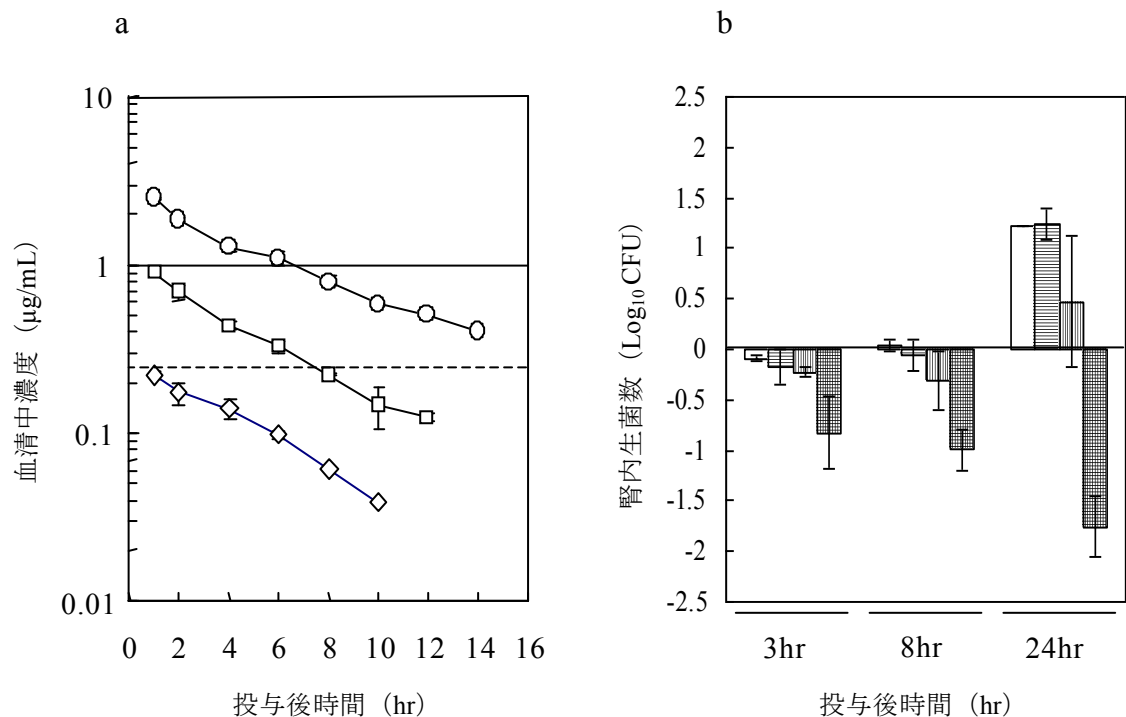


図 3-3 ミカファンギンの血中濃度と *C. albicans* マウス感染モデルにおける腎内静菌数に対する抑制効果との関係

サイクロホスファミド処理したマウスに *C. albicans* 感染させ 1 時間後にミカファンギンを尾静脈内投与した(グラフ上の 0 時間)。a: ミカファンギン投与後の血中濃度 ◇: ×1/3 ED₅₀、□: ×1 ED₅₀ (0.33 mg/kg)、○: ×3 ED₅₀。実線と点線は、各々ミカファンギンの血中 gMIC と sub-gMIC を示す。B: ミカファンギンのマウス感染モデルにおける腎内生菌数に対する抑制効果を測定した(薬物投与後 3、8、そして 24 時間後)。薬物投与時点の腎内生菌数に対する菌数の変動を示す。□: 溶剤投与群、▨: ×1/3 ED₅₀、▤: ×1 ED₅₀、▧: ×3 ED₅₀ 各データは平均±標準偏差を示す。

考察

抗真菌薬の初期創薬において、有望な化合物と基準に満たない化合物を見極めるための簡便で正確な評価系の確立は極めて重要であった。ここではエキノカンディン化合物の血中 gMIC が、投与後 0.5 時間の化合物の血中濃度で補正することにより *in vivo* 効果を良好に予測できることを示した。体内動態パラメーターとして AUC よりも投与後 0.5 時間の血中濃度による補正值の予測性が高い理由は、本感染モデルの特性によると考えられた。化合物の *in vivo* 活性を感度良く評価するために、本モデルにおける *C. albicans* は溶剤投与群のマウスを全例死亡させる最少の接種菌量を設定した。仮に *C. albicans* への感染を最少接種菌量の半量にすると大半のマウスは救命される。つまり延命効果を得るために大きな腎内生菌数の抑制効果を必要としない「病原体と宿主の関係」があるため、化合物から多少でも抗真菌効果が発現されればマウスの延命効果が発揮されることになる。化合物濃度が短時間血中 gMIC に到達すれば抗真菌効果が発揮され延命効果がもたらされたと推察された。したがって抗真菌薬の治療効果に重要な病原体との接触時間を考慮しなくても精度の良好な *in vivo* 効果の予測が可能であった。このようなスクリーニング系の特性を理解することも適正な開発候補品の選択に重要であった。実際ミカファンギンは、 $\times 3$ ED₅₀ 投与群において腎内生菌数を 1/10 に縮小させるために 8 時間を要しており、病原体との接触時間が治療効果に重要なこと示している (図 3-3)。

そして第 2 章において明らかにされたように、血中 gMIC が薬物の有効濃度に相当したことから、エキノカンディンでも確認することは重要であった。ミカファンギンの血中濃度と腎内生菌数の抑制効果を比較した検証結果から血中 gMIC や sub-gMIC は、エキノカンディン化合物の *in vivo* 効果の potency と efficacy の両方を反映し、これらの gMIC 効果や sub-gMIC 効果の総和により *in vivo* 有効性 (efficacy) が決定されることが示唆された。本感染モデル系においても腎内生菌数に対する抑制効果と延命効果が相関することから、血中 gMIC の正確な *in vivo* 効果予測は、これら有効濃度

(potency) に相関し、さらにそれぞれの濃度域における有効性 (efficacy) と相関していることが要因であると示唆された。以上の結果より、血清添加の *in vitro* 抗菌力測定法が創薬において有用であることが示された。本法は、他の作用機序の化合物の *in vivo* 予測にも可能であったことから (43)、今後も新規抗真菌薬の創出に重要な評価法として期待される。

一方、抗真菌薬の PD 解析などでは、いわゆるフリー体仮説に基づき、蛋白結合率から蛋白非結合型の薬物分子を算出して薬物量が推測される (35, 37, 44)。一般的にエキノカンディン誘導体は、蛋白結合率が高い (カスポファンギン : 97%、ミカファンギン : 99.8%) (37)。フリー体仮説に従うと、血中濃度内のカスポファンギンは 3%、ミカファンギンは 0.2% が活性体 (フリー体) と計算されるため、全薬物濃度からの期待活性に比べると各々 33.3 倍と 500 倍の活性低下が予想される。しかしながら、実際の血清添加培地と RPMI 培地における MIC 値の乖離 (カスポファンギン : 1 倍、ミカファンギン : 31.3 倍) は、蛋白結合率では説明できなかった。この知見は蛋白非結合型の薬物分子が作用分子として機能することを否定しないが、フリー体仮説が定量的な解析には適さないことを示唆する。化合物の蛋白結合率には種差が観察され、血清製剤の調整法や測定条件や薬物濃度によってもその値は変動する場合がある (31, 44)。蛋白結合測定など、化合物ごとに詳細な検討がなされない初期創薬において 1 次感染モデル由来の血清中で蛋白結合を包含した抗菌力を測定することは、蛋白結合の観点からも妥当性があると考えられた。

最近になって抗真菌薬の *in vitro* 活性と *in vivo* 活性の乖離やその要因となりうる知見が報告されている。たとえば、① 血清添加と非添加の MIC の差異が蛋白結合率を正確には反映しない (42, 45)、② 生体成分が薬剤排出ポンプを誘導し、アゾール系薬の感受性に影響をおよぼす (46, 47)、③ アゾール系薬の標的であり細胞膜合成酵素の *ERG11* 遺伝子の発現は、血清によって誘導される (48)、などである。生体成分に応答して *C. albicans* は形態変化が誘導される。これまでの抗真菌薬の主な作用点は、形態形成に重要な役割を果たす細胞膜や細胞壁の合成あるいは機能阻害であった。し

たがって、生体成分によって形態形成に必要な細胞構造の構築酵素の発現パターンが変化しその変化による抗真菌活性の変動があるのかもしれない。つまり我々の当初の仮説通り、生体環境固有の MIC が存在する可能性を示唆する。そして、薬剤による遺伝子発現システムを駆使した *C. albicans* を用いて菌糸発育がマウスに対する病原性と関連していることが示されてる (49, 50)。

一般的に抗真菌薬の創薬においては、作用機序や *in vivo* 効果に影響する因子が未解明の化合物であっても、適正に *in vivo* 効果を予測できる *in vitro* 評価系が必要である。したがって、このような予測できない要因にも対応するため、感染部位の環境を徹底して模倣するために血清を希釈せずに用いることと、病原体の病原性を念頭においた評価法が重要だと考えられた。本研究では、薬物の作用点が菌体の増殖抑制であることを前提としたが、宿主免疫系の賦活や病原体の組織破壊酵素に対する抑制など、他の作用点を有する薬物の場合はそれぞれの機序に対応した *in vitro* 評価法の確立が必要となるだろう。

以上、本研究で確立した血清添加培地を用いる MIC 測定法は、薬物の有効血中濃度を推定し薬動学的解析にも応用できる点で、CLSI 標準法を大きく改善した。本法は、新規抗真菌薬の創出や臨床治療の最適化にとって有用な評価法として期待される。

総括

抗真菌薬の *in vivo* 効果を予測可能な *in vitro* 評価系の構築に着手し血清添加の MIC ならびに血中抗菌価測定法を確立した。

(1) 生体環境を模倣する血中 MIC と血中抗菌価アッセイ法の確立

抗真菌薬の *in vivo* 効果を反映する *in vitro* 測定系のために感染モデルの生体環境を模倣するために血清培養系を考案した。

- ① 高濃度血清添加培地として培養系とする。
- ② 病原体の病原性に着目し各薬物の作用機序に合わせて判定基準を設定する。

静菌的な作用を有する薬物に対しては mMIC を、殺菌的に作用する薬物には gMIC を判定基準とした。

さらに、マウス血清中の薬物の抗真菌活性の測定系として、血中 MIC と同じ判定基準を有する *ex vivo* アッセイ系を確立し血中抗菌価として薬物濃度を定量した。血中抗菌価によりマウス血清中の薬物濃度を血中 MIC や sub-MIC に換算して定量化することが可能となった。

フルコナゾールやアムホテリシン B の血中濃度は、血中抗菌価法と HPLC 法からの測定値は近似したが、イトラコナゾールは両方法間で乖離があった。新たに構築した高感度バイオオートグラフィー法は、イトラコナゾールに活性代謝物が生成されることが乖離の原因であることを示した。

(2) 血中 MIC と血中抗菌価は、抗真菌薬の *in vivo* 効果を反映した。

1. 抗真菌薬投与後の血中抗菌価と *in vivo* 効果との関係

播種性カンジダ感染モデルにおいて血中抗菌価を用いた検討により、被検薬物（フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、そしてアムホテリシン B）の血中 MIC と腎内生菌数に対する抑制効果の関係が明らかになった。血中 MIC や sub-MIC

は、抗真菌薬の有効血中濃度（potency）に相当しさらに有効性（efficacy）も関連した。つまり以下のようにこれら有効血中濃度が PD パラメーターの決定因子であると考えられた。

① 効果なし濃度域（血中 sub-MIC 以下）

② sub-MIC 効果（濃度依存的・部分抑制）

③ supra-MIC 効果、MIC 効果（血中 MIC 以上の濃度域：濃度非依存的で最大薬効）

最大薬効では、アゾール系薬は静菌的作用を、アムホテリシン B は殺菌的作用を示した。

また、最小有効濃度が sub-MIC に相当したことから、*in vivo* における PAFE 効果の検出が可能となった。

2.アゾール系薬の *in vivo* 効果を反映した最小有効濃度に基づく PK/PD 解析

薬物の PD パラメーターの決定因子は、有効血中濃度（血中 MIC、sub-MIC）であり、病原体と薬物の接触時間はいずれの効果の発現にも必要であり有効性（efficacy）の決定因子ではなかった。

① Efficacy の飽和を維持することが、薬物の最大薬効を発現する上で重要である。

② アゾール系薬の 1 日の最小用量（ED₉₀）の PD パラメーターは、mMIC 効果に続く time above 血中 sub-mMIC と血中 mMIC 以下の AUC であった。また、本モデルにおいては PAFE 効果の寄与が大きかった。

（3）血中 gMIC によるエキノカンディン化合物の *in vivo* 効果予測性

血中 MIC を化合物の体内動態パラメーターで補正すると良好に感染モデルにおける延命効果（exp. ED₅₀）を予測することが可能であった。

マウス感染モデルの腎内生菌数に対する抑制効果を指標とすると、ミカファンギンでは、血中 gMIC や sub-MIC が *in vivo* 効果の potency とそれぞれの濃度域における efficacy を反映していた。このことが、血中 gMIC の正確な *in vivo* 効果予測性の要因

と考えられた。

以上、本検討の結論として生体を反映する培養環境を模倣し、病原体の病原性に着目した *in vitro* 評価法が、抗真菌薬の *in vivo* 効果を予測するために極めて重要であった。血中 MIC や sub-MIC が薬物の *in vivo* 効果（potency と efficacy）を反映することが高い予測性の要因であると考えられた。本評価系は、抗真菌薬の創薬や臨床における投与設計などに有効に貢献するものと期待される。

謝辞

本博士論文は、旧藤沢薬品工業〈株〉薬理研究所、アステラス製薬 薬理研究所、ならびに京都大学大学院 生体機能解析学分野で実施いたしました。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を頂き、かつ本研究の発表の機会を賜り御校閲いただきました京都大学大学院 生体機能解析学分野 金子 周司 教授に謹んで謝意を表します。また本研究の着想の基礎をご指導賜り常に暖かくご支援を賜りました京都大学 河合 明彦 名誉教授に心から感謝申し上げます。

本研究のきっかけを与えていただき、感染症創薬の基礎をご指導賜りましたアステラス製薬株式会社 旧醗酵研究所 所長 俵 修一 博士、旧薬理研究所 担当主任研究員 池田 文昭 博士、生物工学研究所 日野 資弘 前所長、旧藤沢薬品工業株式会社 新薬研究所 リーダー主任研究員 上村 利明 博士、化学研究所 故担当研究員 坂根 和夫 博士、醗酵研究所 担当研究員 橋本 正治 博士、そしてリーダー主任研究員 堀 康宏 博士 に深謝いたします。

さらに本研究を完遂させるまでの貴重な機会を与えていただき、終始御援助を賜りましたアステラス製薬株式会社 薬理研究所 前所長 武藤 誠太郎 博士、所長 内田 渡 博士、薬理研究所 室長 関 信男 博士に深謝申し上げます。また有益な議論と助言を賜りました松本 哲 主席研究員、化学研究所 前室長 デビット・バレット 博士、室長 富島 昌紀 博士、前専任理事 大木 秀徳 博士、山田 明前リーダー主任研究員、化学研究所 小山 英子 前研究員、ならびに旧醗酵研究所 室長 藤江 昭彦 博士に御礼申し上げます。また本研究に多大なご貢献を賜りました 旧藤沢薬品工業 薬理研究所 井口 由美 研究員、森山 悦子 研究員、米谷 知子 研究員、牛谷 友栄 研究員、中岡 恭子 研究員、高山 芳子 研究員、ならびに明 美穂 研究員に深謝いたします。

本研究の完遂のためにご懇切なるご指導とご厚情そして激励を賜りましたオタゴ大学 Ann Holmes 博士、新見 昌一 博士、新見 京子 博士に心から深謝いたします。

発表論文目録

本研究は以下の論文に公表した。

1. Determination of antifungal activities in serum samples from mice treated with different antifungal drugs allows detection of an active metabolite of itraconazole

Katsuyuki Maki, Etsuko Watabe, Yumi Iguchi, Hideko Nakamura, Masaki Tomishima, Hidenori Ohki, Akira Yamada, Satoru Matsumoto, Fumiaki Ikeda, Shuichi Tawara, Seitaro Mutoh

平成 18 年 4 月発行 Microbiology and Immunology 第 50 巻 第 4 号 281 頁～292 頁

2. Direct comparison of the pharmacodynamics of four antifungal drugs in a mouse model of disseminated candidiasis using microbiological assays of serum drug concentrations

Katsuyuki Maki, Ann R. Holmes, Etsuko Watabe, Yumi Iguchi, Satoru Matsumoto, Fumiaki Ikeda, Shuichi Tawara, Seitaro Mutoh

平成 19 年 11 月発行 Microbiology and Immunology 第 51 巻 第 11 号 1053 頁～1059 頁

3. Effective concentration-based serum pharmacodynamics for antifungal azoles in a murine model of disseminated *Candida albicans* infection

Katsuyuki Maki, Shuji Kaneko

平成 25 年発行 European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics

4. Use of a serum-based antifungal susceptibility assay to predict the in vivo efficacy of novel echinocandin compounds

Katsuyuki Maki, Satoru Matsumoto, Etsuko Watabe, Yumi Iguchi, Masaki Tomishima,

Hidenori Ohki, Akira Yamada, Fumiaki Ikeda, Shuichi Tawara, Seitaro Mutoh

平成 20 年 8 月発行 Microbiology and Immunology 第 52 巻 第 8 号 383 頁～391
頁

引用文献

1. 山口英世, 病原真菌と真菌症 改訂 4 版 (2007) 南山堂
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39:309-317
3. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 37:1172-1177
4. Odds FC, Brown AJ, Gow NA (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11:272-279
5. Lass-Flörl C (2011) Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs* 71:2405-2419
6. Sugar AM, Anaissie EJ, Graybill JR, Patterson TF (1992) Fluconazole. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl. 1:201-212
7. Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Takasugi H, Maki K, Tawara S, Tanaka H (1999) FK463, a novel water-soluble echinocandin lipopeptide: synthesis and antifungal activity. *J Antibiot* 52:674-676
8. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F, Kuwahara S (2000) In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 44:57-62
9. Ikeda F, Wakai Y, Matsumoto S, Maki K, Watabe E, Tawara S, Goto T, Watanabe Y,

- Matsumoto F, Kuwahara S (2000) Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 44:614-618
10. Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC (2011) Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 71:11-41
 11. Iwamoto T, Fujie A, Sakamoto K, Tsurumi Y, Shigematsu N, Yamashita M, Hashimoto S, Okuhara M, Kohsaka M (1994) WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Antibiot* 47:1084-1091
 12. Iwamoto T, Fujie A, Nitta K, Hashimoto S, Okuhara M, Kohsaka M (1994) WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides. II. Biological properties. *J Antibiot* 47:1092-1097
 13. Hashimoto S (2009) Micafungin: a sulfated echinocandin. *J Antibiot* 62:27-35
 14. Saag MS, Dismukes WE (1988) Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1-8
 15. Cutler JE (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45:187-218.
 16. Odds FC, Cockayne A, Hayward J, Abbott AB (1985) Effects of imidazole- and triazole-derivative antifungal compounds on the growth and morphological development of *Candida albicans* hyphae. *J Gen Microbiol*. 131:2581-2589
 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth

- dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
19. Lass-Flörl C, Mayr A, Perkhofer S, Hinterberger G, Hausdorfer J, Speth C, Fille M (2008) Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3637-3641
 20. Inagaki K, Takagi J, Lor E, Okamoto MP, Gill MA (1992) Determination of fluconazole in human serum by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 14:306-311
 21. Warnock DW, Turner A, Burke J (1988) Comparison of high performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 21:93-100
 22. Nilsson-Ehle I, Yoshikawa TT, Edwards JE, Schotz MC, Guze LB (1977) Quantitation of amphotericin B with use of high-pressure liquid chromatography. *J Infect Dis* 135:414-422
 23. Sakamoto H, Hirose T, Nakamoto S, Hatano K, Shibayama F, Kikuchi H, Mine Y, Kuwahara S (1988) Pharmacokinetics of FK482, a new orally active cephalosporin, in animals. *J Antibiot* 41:1896-905
 24. Conte JE Jr, Golden JA, Kipps, J, McIver, M, and Zurlinden, E (2004) Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of itraconazole and 14-hydroxyitraconazole at steady state. *Antimicrob Agents Chemother* 48 3823-3827
 25. Heykants J, Van Peer A, Van de Velde V, Van Rooy P, Meuldermans W, Lavrijsen K, Woestenborghs R, Van Cutsem J, and Cauwenbergh G (1989) The clinical pharmacokinetics of itraconazole: an overview. *Mycoses* 32 Suppl. 1:67-87
 26. Hostetler JS, Heykants J, Clemons KV, Woestenborghs R, Hanson LH, Stevens DA (1993)

- Discrepancies in bioassay and chromatography determinations explained by metabolism of itraconazole to hydroxyitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 37:2224-2227
27. Daneshmend TK, Warnock DW, Ene MD, Johnson EM, Potten MR, Richardson MD, Williamson PJ (1984) Influence of food on the pharmacokinetics of ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 25:1-3
28. Van Cauteren H, Heykants J, De Coster R, Cauwenbergh G (1987) Itraconazole: pharmacologic studies in animals and humans. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 1:S43-46
29. Humphrey MJ, Jevons S, Tarbit MH (1985) Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* 28:648-653
30. Heinemann V, Kähny B, Jehn U, Mühlbayer D, Debus A, Wachholz K, Bosse D, Kolb HJ, Wilmanns W (1997) Serum pharmacology of amphotericin B applied in lipid emulsions. *Antimicrob Agents Chemother* 41:728-732
31. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ (2002) Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother* 46:834-840
32. Andes D, van Ogtrop M (1999) Characterization and quantitation of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2116-2120
33. Andes D, Stamsted T, Conklin R (2001) Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 45:922-926
34. Andes D (2003) In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis.

35. Andes D (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am* 20:679-697
36. Louie A, Drusano GL, Banerjee P, Liu QF, Liu W, Kaw P, Shayegani M, Taber H, Miller MH (1998) Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1105-1109
37. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H (2006) Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 45:649–663
38. Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE (2006) Pharmacodynamic activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 50:469-473.
39. Ernst EJ, Klepser M., Pfaller MA (2000) Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1108–1111
40. García MT, Llorente MT, Lima JE, Mínguez F, Del Moral F, Prieto J (1999) Activity of voriconazole: post-antifungal effect, effects of low concentrations and of pretreatment on the susceptibility of *Candida albicans* to leucocytes. *Scand J Infect Dis* 31:501–504
41. Mínguez F, Chiu ML, Lima JE, Níque R, Prieto J (1994) Activity of fluconazole: postantifungal effect, effects of low concentrations and of pretreatment on the susceptibility of *Candida albicans* to leucocytes. *J Antimicrob Chemother* 34:93–100
42. Zhanel GG, Saunders DG, Hoban DJ, Karlowsky JA (2001) Influence of human serum on antifungal pharmacodynamics with *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2018–2022
43. Hanadate T, Tomishima M, Shiraishi N, Tanabe D, Morikawa H, Barrett D, Matsumoto S, Ohtomo K, Maki K (2009) FR290581, a novel sordarin derivative: synthesis and antifungal activity. *Bioorg Med Chem Lett* 19:1465-1468
44. Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW, Cars O, Craig WA, Andes D, Theuretzbacher U

- (2011) Protein binding: do we ever learn? *Antimicrob Agents Chemother* 55:3067-3074
45. Odabasi Z, Paetznick V, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L (2007) Effects of serum on in vitro susceptibility testing of echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4214-4216
46. Larsen B, Anderson S, Brockman A, Essmann M, Schmidt M (2006) Key physiological differences in *Candida albicans* *CDRI* induction by steroid hormones and antifungal drugs. *Yeast* 23:795-802
47. Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami NS, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M (2007) The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother* 60 1264-1272
48. Song Y, Cheon SA, Lee KE, Lee SY, Lee BK, Oh DB, Kang HA, Kim JY (2008) Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 19:5456-5477
49. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic Cell*:2 1053–1060
50. Saville SP, Lazzell AL, Bryant AP, Fretzen A, Monreal A, Solberg EO, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Milne GT (2006) Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3312-3316